BEITRÄGE

ZUR

BIOLOGIE DER FLUORESCIERENDEN BAKTERIEN.

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

EINER HOHEN

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

KARL THUMM

AUS KARLSRUHE.

EMMENDINGEN.
DRUCK VON A. DÖLTER.
1895.

BEITRÄGE

ZUR

BIOLOGIE DER FLUORESCIERENDEN BAKTERIEN.

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

EINER HOHEN

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

KARL THUMM

AUS KARLSRUHE.

EMMENDINGEN.
DRUCK VON A. DÖLTER.
1895.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543921_0181

Seiner lieben Mutter

in Dankbarkeit gewidmet

vom

Verfasser.

Einleitung.

Innerhalb der grossen Gruppe der Farbstoff bildenden Bakterien lassen sich wieder einige Untergruppen unterscheiden, von denen diejenige, welche die Arten mit der Fähigkeit fluorescierende Farbstoffe zu bilden umfasst, am schärfsten hervortritt. Die einzelnen hierher gehörigen Arten lassen sich zwar durch kulturelle und morphologische Merkmale — in letzterer Hinsicht namentlich durch das Vorhandensein oder Fehlen der Sporenbildung oder durch die Art der Begeisselung — leicht von einander unterscheiden, zeigen jedoch schon auf den ersten Blick ihre nahe Zusammengehörigkeit durch die allen gemeinsame Eigenschaft, dem Nährsubstrat eine grüne Fluorescenz mitzuteilen, während die Kolonien selbst meist farblos bleiben. Diese Grünfärbung ist durchaus nicht überall vollkommen die gleiche, es lassen sich vielmehr je nach den einzelnen Arten und je nach der Zusammensetzung des Nährmediums alle Schattierungen zwischen himmelblau und dunkelgrün erkennen. Alle diese verschiedenen Färbungen besitzen jedoch die gemeinsame Eigenschaft, bei der geringsten Menge freier Säure sofort zu verschwinden, um nach dem Abstumpfen derselben mit irgend einem Alkali wieder zu erscheinen.

Obschon seit langer Zeit bekannt war, dass die manchmal in gewissen tierischen Flüssigkeiten beobachtete grüne Fluorescenz auf die Thätigkeit von Mikroorganismen zurückzuführen sei, gelang es doch erst nach einer langen Reihe von Jahren die Erreger selbst zu isolieren und genau zu beschreiben.

Im Jahre 1872 finden sich in Cohn's Beiträgen zur Biologie der Pflanzen die ersten Angaben über fluorescierende Bakterien, Bacterium termo und Micrococcus chlorinus (1, 1).

Im Jahre 1875 wurde von Eidam aus faulender Eiweissflüssigkeit der Bacillus erythrosporus isoliert (2. 288; 1. 3. 128).

Vier Jahre darauf (1879) beschrieb Miquel in den Annales de Montsouris einen fluorescierenden Organismus und nannte ihn Bactérie commune.

In das darauffolgende Jahr (1880) fielen die Veröffentlichungen Neelsen's über den Erreger der blauen Milch, den Bacillus syncyaneus (1, 3, 187), jedoch wurde derselbe erst von Hüppe (3, 2, 355) im Jahre 1887 rein gezüchtet und auf seine biologischen Eigenschaften eingehend untersucht.

1882 gelang es Gessard aus grünlich gefärbtem Eiter sehr bewegliche Stäbchen, den Bacillus pyocyaneus, zu erhalten und als die Ursache der Grünfärbung zu erkennen (4, XCIV, 8; 5, 269).

Im Jahre 1886 führte Flügge in seinen Mikroorganismen ausser einigen, schon erwähnten Arten noch 3 neue fluorescierende auf, Micrococcus versicolor (2, 288/9), Bacillus fluorescens putidus und Bacillus fluorescens liquefaciens. In demselben Jahre konnte Schrötter aus Staub den Micrococcus diffluens erhalten (6, 144).

In dem nächsten Jahre (1887) erschienen mehrere Arbeiten über neue fluorescierende Arten. Ausser der schon erwähnten Arbeit von Hüppe über den Bacillus der blauen Milch ist in erster Linie die Untersuchung Ernst's (7, 2, 369) über eine Varietät des Bacillus pyocyaneus zu nennen, die sich von der durch Gessard gefundenen Form nur durch veränderte Farbstoffproduktion unterscheidet. Ausserdem fand Reimann (8; 5, 270) in Nasensekret von Ozoena den Bacillus smaragdinus foetidus und Klamann (9, 1887, 1347) im Nasenrachenraum den Diplococcus fluorescens foetidus.

Aus Trinkwasser isolierte Adametz (10, 1888) im Jahre 1888 einen hierher gehörigen Organismus und bezeichnete ihn als blaugrün fluorescierendes Bacterium. In demselben Jahre gelang es Schmelck (11, 4, 545) eine in Eiswasser und Schnee lebende Art, Bacillus fluorescens nivalis, zu isolieren und brachte dieselbe infolge ihres häufigen Auftretens mit der eigentümlich grünen Farbe des Gletscherwassers in Verbindung. In dasselbe Jahr fällt dann noch die Veröffentlichung von Lesarge (12, 20, 212) über den Bacille de la diarrhée verte, den er aus den Entleerungen an grüner Diarrhöe erkrankter Kinder erhielt.

Im Jahre 1889 wurde aus Wasser der Bacillus fluorescens non liquefaciens (5, 118) isoliert, sodann von Maggiora (13, 1889) der Micrococcus fluorescens und von Frick (14, 116, 292) 3 verschiedene Species: Bacillus iris, Bacillus virescens, Bacillus viridis pallescens.

Das Jahr 1890 brachte die Veröffentlichungen Zimmermann's über die Bakterien des Chemnitzer Leitungswassers, unter denen 4 neue fluorescierende Arten aufgeführt sind: Bacillus fluorescens tenuis

(15, 16), Bacillus fluorescens albus (15, 18), Bacillus fluorescens longus (15, 20) und Bacillus fluorescens aureus (15, 14). Ausserdem sind noch die Arbeiten von Winkler und Schrötter (16) über den Bacillus melochloros und von Billet (17, 1890) über Bacterium osteophilum zu nennen.

Im Jahre 1891 veröffentlichte Lafar (18, 13, 1) seine Untersuchungen über Butter und erwähnte hierbei eine häufig vorkommende Art, den Bacillus butyri fluorescens und Eisenberg führte in demselben Jahre in seiner bakteriologischen Diagnostik (5, 57) den von Unna und Tommasoli (19, 8, 57) schon früher auf menschlicher Haut gefundenen Bacillus fluorescens liquefaciens minutissimus an. Ferner fand Tartaroff (20,) in Wasser den Bacillus fluorescens mesentericus und den Bacillus fluorescens putidus colloides.

In dem nächsten Jahre (1892) isolierte Jäger (7, 12, 525) von Kranken, welche an Ikterus litten, eine neue fluorescierende Art, den Bacillus proteus fluorescens.

Von all diesen vorstehend angeführten Arten sind jedoch nur wenige eingehender auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht worden. In erster Linie ist hier der Organismus des blauen Eiters und der der blauen Milch zu nennen, denen weitaus die meiste Beachtung zugewendet wurde. Ausser diesen beiden fand noch Bacillus fluorescens liquefaciens und Bacillus fluorescens putidus eine wenn auch viel geringere Berücksichtigung, während die anderen Arten überhaupt nicht auf ihre Farbstoffproduktionen hin untersucht wurden.

Von Bacillus pyocyaneus und Bacterium syncyaneum ist über die Natur der Farbstoffe und über die Beziehung derselben zu der Zusammensetzung des Nährsubstrates folgendes bekannt:

Als Gessard im Jahre 1882 den Bacillus pyocyaneus als die Veranlassung zur Bildung des blauen und grünen Eiters erkannte, konnte er zugleich feststellen, dass der Organismus sowohl auf festen wie in flüssigen Nährböden denselben Farbstoff bildet. Später wurde dann der färbende Stoff isoliert und konnte mit dem schon seit dem Jahre 1859 bekannten blauen Farbstoff Pyocyanin identificiert werden, den Fordos (21, 1859) aus grünem Eiter gewonnen hatte. Nach einigen Jahren gelang es auch, das Oxydationsprodukt dieses Pyocyanins die Pyoxanthose zu erhalten, ein braunroter Farbstoff, der in älteren Kulturen regelmässig zu beobachten ist.

Im Jahre 1887 stellte Ernst (7, 2, 369) eine Abart des Bacillus pyocyaneus auf und bezeichnete dieselbe als β-Form, im Gegensatz zu der von Gessard beschriebenen α-Form. Beide Varietäten zeigten zwar in morphologischer Hinsicht vollständige Übereinstimmung, liessen jedoch bezüglich ihrer Farbstoffproduktion und der

Intensität der Verflüssigung der Gelatine deutliche Unterschiede erkennen.

So zeigt eine einen Monat alte Gelatinekultur einer α-Varietät teilweise Verflüssigung. Die verflüssigte Schicht ist grell hellgrün gefärbt und besitzt eine starke Fluorescenz. In der nicht verflüssigten Schicht ist der Farbstoff in gleicher Stärke sichtbar. Die Kultur bei Gaslicht betrachtet erscheint vollständig farblos.

Die Gelatine in einer Kultur der β-Form ist in der gleichen Zeit vollständig verflüssigt. Die mehr blaugrüne Färbung an der Oberfläche nimmt nach unten hin an Stärke stets ab, ist jedoch bis an den Boden des Kulturgefässes deutlich zu erkennen. Beim Umschütteln färbt sich die Flüssigkeit dunkler und nimmt zugleich eine rein laubgrüne Farbe an. Diese schön grüne Färbung ist auch bei Gaslicht mit voller Deutlichkeit zu erkennen.

Ähnliche Farbenunterschiede wie in Gelatine sind auch in einer Agarkultur zu beobachten. Der Nährboden der α-Form ist dunkelgrün, der der β-Form mehr hellgrün gefärbt.

Die grössten und charakteristischten Unterschiede zwischen beiden Formen beobachtete Ernst bei der Kartoffelkultur.

Eine Kultur der α-Form, welche 3mal 24 Stunden im Brutschrank gezüchtet wurde, lässt eine hellgrüne Färbung des Substrates erkennen, die in den nächsten Tagen an Stärke zunimmt. Findet die Kultur dagegen bei gewöhnlicher Temperatur statt, so ist noch nach 8 Tagen nicht die geringste Farbstoffbildung zu beobachten. Diese tritt jedoch nach 20stündiger Kultur im Brutschrank sofort ein. Eine Kartoffelkultur, Ammoniakdämpfen ausgesetzt, zeigt Fluorescenzerscheinung.

Eine Kultur der β-Form hingegen, gleichlang im Brutschrank kultiviert, besitzt eine intensiv grüne Farbe, die gleichfalls an den darauffolgenden Tagen an Intensität zunimmt. Bei gewöhnlicher Temperatur ist ebenso wie bei der α-Varietät eine Färbung nicht zu erkennen. Diese zeigt sich jedoch nach 20stündiger Kultur im Brutschranck. Wird eine farblose Kultur Ammoniakdämpfen ausgesetzt, so ist keine Färbung im Substrat zu beobachten. Ausser diesen Unterschieden fand Ernst als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal das nur der β-Form eigentümliche Chamäleonphenomen: „Berührt man mit dem Platindraht an irgend einer Stelle die braune Kolonie, so nimmt die tangierte Stelle nach 2 bis 5 Minuten ein intensiv dunkles Blattgrün an, nach 10 Minuten erreicht diese Erscheinung ihr Maximum, beginnt dann langsam zu verblassen und ist nach einer halben Stunde wieder vollständig verschwunden.“ Dieses unerwartete Auftreten eines Farbstoffes in der Kolonie selbst,

die sonst nie das grüne Stoffwechselprodukt zeigt, ist sehr merkwürdig. Ernst suchte diese Erscheinung durch Oxydationsvorgänge zu erklären.

Auf Grund all dieser Verschiedenheiten, besonders des Verhaltens der Gelatinekulturen gegen Licht, das schon in den ersten Tagen nach erfolgter Impfung scharf hervortritt und mithin nicht auf grössere oder geringere Mengen Pigment zurückgeführt werden kann, nimmt Ernst bei den beiden Varietäten die Produktion verschiedener Farbstoffe an. Er stützt diese Ansicht noch darauf, dass er aus den einzelnen Kulturen verschiedene Krystalle erhielt und zwar aus der Kultur einer β-Form mit Chloroform azurblaue, hingegen aus einer solchen der α-Form grünlich schimmernde Krystalle.

Diese Arbeit von Ernst und seine Annahme von verschiedenen Farbstoffen war nun die Veranlassung zu einer Reihe von Versuchen, die sich auf die Pigmentbildung dieses so auffallenden Organismus bezogen. In erster Reihe sind die Arbeiten von Ledderhose, Kunz, Babes zu nennen, die den Schwerpunkt bei ihren Untersuchungen ausschliesslich in die chemische Natur und die Darstellung des Farbstoffes legten.

Ledderhose (22, 1888) gelang es den Farbstoff mit Chloroform zu isolieren und hierauf dessen picrinsaures Salz darzustellen. Dieses bildet schwarzbraune, nadelförmige Krystalle und eine Analyse dieses Körpers ergiebt für Pyocyanin die empyrische Formel $C_{14}H_{14}N_2O$; dasselbe gehört also zur Gruppe der Stickstoffsubstanzen und ist schwefelfrei[1]. Ledderhose nimmt bei der Bildung desselben durch die Bakterienzelle an, dass das Pigment als Leukofarbstoff ausgeschieden werde und erst durch den Sauerstoff der Luft in Pyocyanin übergehe. Er stützt diese Annahme auf seine Beobachtung, dass an den Stellen des Wundverbandes, an denen der Luftsauerstoff ungehindert Zutritt hat, die grüne Fluorescenz am intensivsten auftritt. Von dieser Ansicht ausgehend sucht er die Thatsache, dass sich der Farbstoff in der verflüssigten Gelatine einer Bacillus pyocyaneus-Kultur an der Oberfläche befindet und sich beim Schütteln gleichmässig in dem ganzen Nährboden verteilt, in folgender Weise zu erklären. Die am Grunde von Reagensglaskulturen lebenden Bakterien sollen das Pyocyanin ihres Bereiches zu Leukofarbstoff reducieren, der dann beim Schütteln durch den Sauerstoff der Luft wieder zu Farbstoff oxydiert wird.

Kunz (23, 1888) konnte ausser den zwei bisher bekannten Farbstoffen, dem Pyocyanin und dessen Oxydationsprodukt der

[1] Fordos wies bei seinem Pyocyanin qualitativ einen Schwefelgehalt nach. (21, 1859).

Pyoxanthose, noch einen 3. Farbstoff isolieren. Dieser wird nur in sehr geringer Menge gebildet. Er ist in Wasser und Alkohol löslich, in Chloroform, Äther, Amylalkohol unlöslich; seine ammoniakalische Lösung zeigt im auffallenden Lichte betrachtet eine schön grüne Fluorescenz und im durchfallenden Lichte eine gelbe Färbung.

Babès (24, 1889) isolierte im Jahre 1889 aus Gelatinekulturen, die bei Zimmertemperatur gezüchtet waren, ebenfalls 3 verschiedene Pigmente, nämlich:

1) Einen azurblauen Farbstoff. Die alkoholischen Lösungen sind rein blau. Säuren verändern diese Farbe in rot. Beim Verdunsten krystallisieren aus beiden Lösungen blaue, rhombische Prismen aus. Dieser Farbstoff entspricht dem Pyocyanin von Fordos.

2) Einen Farbstoff, dessen Lösung im durchfallenden Lichte eine smaragdgrüne Färbung besitzt. Derselbe ist in Wasser löslich, in Chloroform unlöslich. Seine alkalische Lösung zeigt Dichroismus, der jedoch auf Zusatz einer Säure verschwindet.

Dieses Pigment ist jedoch kein einheitlicher Farbstoff, sondern setzt sich aus 2 Farbstoffen zusammen und zwar aus:

a. Einem in Alkohol löslichen Farbstoff. Dieser ist im durchfallenden Lichte blaugrün, im auffallenden blau.

b. Einem in Alkohol unlöslichen Farbstoff. Derselbe erscheint im auffallenden Lichte blaugrün, im durchfallenden Lichte dunkelorangegelb.

Während bei sämtlichen bisher angeführten Arbeiten die Verfasser sich nur mit der Isolierung der gebildeten Pigmente beschäftigen, berücksichtigte dagegen Gessard ausserdem noch die biologischen Verhältnisse. In einer ganzen Reihe umfassender Arbeiten[2] weist er auf die grossen Veränderungen hin, die der Farbstoff in den verschiedenen Nährmedien erleidet, und giebt zugleich eine genaue Übersicht der von Bacillus pyocaneus gebildeten Pigmente.

In wässeriger Peptonlösung, die frei von jeder Spur Eiweiss ist, wird nur der blaue Farbstoff, das Pyocyanin gebildet, im frischen Hühnereiweiss hingegen nur das fluorescierende Pigment. In Fleischwasserpeptonbouillon, in der beide Substanzen enthalten sind, ent-

---

[2] Von Arbeiten Gessard's gehören hierher:

Sur les pigments divers produits par le microbe pyocyanique (25, 1890, Nr. 9. S. 67).

Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique (26, 1890).

Des races de bacille pyocyanique (26, 1891).

Sur la fonction fluorescigène des microbes (26, 1892).

wickeln sich auch beide Pigmente. Es ist dies deutlich zu erkennen durch Schütteln der Kultur mit Chloroform. Letzteres färbt sich schön blau und die Bouillon bleibt grün. Ausser in Eiweiss-freiem Pepton erhält man auch in Speichel rein blau wachsende Kolonien, ausserdem noch auf Pepton-Glycerin-Agar. Wird eine solche Kultur, die nur blauen Farbstoff bildet, auf Eiweiss übergeimpft, entsteht wieder sofort die grüne Fluorescenz. Umgekehrt entwickelt eine nur grüne Fluorescenz bildende Kultur in Peptonlösung nur Pyocyanin. Ausser diesen 2 Farbstoffen bildet der Organismus noch einen dritten, braunroten Farbstoff, das Pyoxanthin. Derselbe ist in Kartoffelkulturen und am besten auf Eigelb[3] zu beobachten.

Jedoch nicht die Variation der Nährmedien allein beeinflusst die Farbstoffproduktion. Schon das Erwärmen einer Bouillonkultur auf 37° oder das Durchführen des Bacillus pyocyaneus durch den Tierkörper raubt den Bakterien die Fähigkeit, das Pyocyanin zu bilden. Steigert man die Temperatur auf 38° und impft hiervon in frische Bouillon ab, so erhält man Kulturen, die überhaupt kein Pigment mehr bilden.

Auf diese Art gelang es Gessard 8 verschiedene Raçen zu erhalten. Alle diese verschiedenen Nährstoffvarietäten nehmen jedoch sofort die Eigenschaften des normalen Bacillus pyocyaneus an, wenn sie auf einen Nährboden abgeimpft werden, bei dem die ursprünglichen Existenzbedingungen vorhanden sind.

In der letzten diesbezüglichen Arbeit „Sur la fonction fluorescigène des microbes" geht Gessard auf die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Zusammensetzung des Nährmediums noch näher ein. Er hält sich auch hier hauptsächlich an den Bacillus pyocyaneus, überträgt jedoch die bei denselben gefundenen Resultate auf die übrigen fluorescierenden Arten.

Zunächst untersuchte Gessard die verschiedenen Peptone des Handels und fand hierbei bezüglich des Auftretens der Färbungen grosse Unterschiede. Bald wurde nur das blaue, bald nur das grüne Pigment gebildet. Um nun diesen Verschiedenheiten auf die Spur zu kommen, wählte er an Stelle des compliciert zusammengesetzten Peptonmoleküls eine solche Nährlösung, die ganz genau bekannte, einfachere chemische Körper enthielt. Als solche benutzte er die von Hüppe für den Organismus der blauen Milch empfohlene Nährlösung, doch verwendete er an Stelle des weinsauren Ammoniaks das bernsteinsaure Salz.

[3] Das Auftreten von Pyoxanthin auf Eigelb wurde nicht von Gessard, sondern von Rohrer (11. 1892. 333) beobachtet.

Mithin hatte die Nährlösung folgende Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	100	gr
Kaliumphosphat[4]	0,5	gr
Magnesiumsulfat	0,25	gr
Chlorcalcium	0,125	gr
Bernsteinsaures Ammon	1	gr

In dieser Lösung zeigt der Organismus des blauen Eiters das gleiche Wachstum wie in Bouillon und beide Pigmente, sowohl das blaue wie das fluorescierende wurden gebildet. Lässt man aus einer solchen Nährlösung das Kalksalz weg, so tritt keine Änderung in des Farbstoffbildung ein. Wenn jedoch das Phosphat weggelassen wird, ist nur ganz unbedeutendes Wachstum zu beobachten, die Flüssigkeit ist deutlich blau gefärbt und zeigt keine Spur von Fluorescenz. In dieser Lösung tritt nach Phosphatzusatz die Fluorescenz wieder auf. Nachdem Gessard hierdurch die Wichtigkeit der Phosphorsäure bei der Produktion des fluorescierenden Pigmentes erkannt hatte, setzte er zu den Peptonen, die früher nur die blaue Farbe gezeigt hatten, Phosphat zu, worauf dann stets ebenfalls die Fluorescenz eintrat. Hieraus zog er den Schluss, dass nur der Mangel an Phosphorsäure das Fehlen der Fluorescenz bedingt habe.

Nach Feststellung dieser Thatsache suchte er die Menge Phosphat kennen zu lernen, die zur Bildung von Fluorescenz vorhanden sein muss und stellte zu diesem Zwecke Nährlösungen mit wechselnden Mengen Phosphorsäure her. Er fand hierbei, dass bis zu einem Gehalt von 0,00625 p. Ct. Phosphat nur Pyocyanin, von 0,13 p. Ct. an und darüber nur Fluorescenz, bei den zwischen beiden Werten liegenden Mengen beide Pigmente gebildet werden.

Auf Grund dieser Experimente folgert dann Gessard: Beim Vorwiegen von stickstoffhaltiger Substanz wird nur Pyocyanin, beim Vorwiegen von Phosphat wird nur Fluorescenz, bei einem Gleichgewichtszustand hingegen werden beide Pigmente gebildet.

Bei der Zusammenfassung seiner Resultate weist der Verfasser auf die Wichtigkeit der Phosphorsäure bei der Bildung des fluorescierenden Pigmentes hin. Er nimmt an, dass bei der Abwesenheit des Farbstoffes auch zugleich auf das Nichtvorhandensein von Phosphorsäure zu schliessen sei. Auf Grund dieser Annahme empfiehlt er den Bacillus pyocyaneus als Reagens auf Phosphat, wobei derselbe noch $^1/_{8000}$ nachweisen soll.

Die Resultate, welche Gessard bei seinen Arbeiten erhalten hat, habe ich in Vorstehendem etwas ausführlicher behandelt, weil ich

[4] Unter Kaliumphosphat ist hier das neutrale Salz verstanden von der Constitution $K_2 H P O_4$.

bei meinen Untersuchungen von diesen ausgegangen bin und sehr häufig auf dieselben werde zurückkommen müssen.

Ausser Gessard untersuchte noch Rohrer (11, 11, 327) das Verhalten des Bacillus pyocyaneus in verschiedenen Nährmedien. Als solche verwandte er Peptonlösung, Bouillon, Eiweiss, Eigelb, Speichel, Nährgelatine, Agar und Kartoffel und kommt hierbei zu den gleichen Resultaten wie Gessard. Nährlösungen wurden von ihm nicht angewendet.

Sodann ist noch die Arbeit von Jakowsky (7, 15, 474) zu nennen, der die letzten Produkte der Eiweisszersetzung durch die Bakterien des blauen Eiters untersuchte. In der Einleitung hierzu stellt er die Identität des von ihm verwendeten Bacillus pyocyaneus fest und erwähnt, dass es ihm gelungen sei mit Hülfe der Buchnerschen Methode oder unter einer Schicht flüssigen Paraffins anaerobiotische Kulturen des Organismus zu erhalten. Die Entwicklung desselben ist nur sehr schwach und langsam. Als besonders wichtig führt Jakowsky hierbei die Thatsache an, dass keine Pigmentbildung stattfindet.

Dies sind die wichtigsten Ergebnisse, welche die bisherigen Untersuchungen über die Farbstoffe von Bacillus pyocyaneus zu Tage gefördert haben.

Der zweite hierher gehörige Organismus, welcher gleichfalls sehr eingehend untersucht wurde, ist das Bacterium syncyaneum, der Erreger der Blaufärbung der Milch. Derselbe weicht bezüglich seiner Farbstoffproduktion bedeutend von den andern fluorescierenden Bakterien ab, indem er ausser dem fluorescierenden Pigment noch einen stahlblauen Farbstoff bildet. Letzterer wurde lange Zeit allein beobachtet, indem man die Bildung des Ersteren stets einem zweiten Organismus zuschrieb.

Trotzdem Bacterium syncyaneum nie zusammen mit den übrigen fluorescierenden Bakterien aufgeführt wird, erwähne ich es doch an dieser Stelle, weil dasselbe nicht nur wegen der Fähigkeit, fluorescierendes Pigment zu bilden, hierher gehört, sondern auch durch seine morphologischen Eigenschaften seine nahe Verwandtschaft zu den übrigen fluorescierenden Arten bekundet.

Das Blauwerden der Milch ist eine seit langer Zeit beobachtete Erscheinung[5] und wurde schon im Jahre 1838 von Steinhoff (27, 1838, 7 u. 8) auf einen Ansteckungsstoff zurückgeführt. Im Jahre 1841 erbrachte dann Fuchs (28, 7, 133) durch zahllose Impfungen

[5] Eine genaue Angabe über die Geschichte und Verbreitung der blauen Milch giebt Neelsen: Studien über blaue Milch (1, 3, 187).

den direkten Beweis, dass die geringste Spur des Contagiums genüge, um in jeder gesunden Milch ohne Ausnahme die gleiche Erscheinung hervorzurufen. Haubner (28, 18, 1852) fand im Jahre 1852 ausser einer Reihe von anderen Thatsachen, dass die Milch sich um so deutlicher blau färbte, je langsamer dieselbe alkalisch wurde.

Im Jahre 1880 trat Neelsen (1, 3, 187) durch eingehende Versuche diesen Fragen näher. Er bestätigte zunächst die von Haubner gefundene Thatsache, dass jede Milch ohne Ausnahme infiziert werden konnte und dass ausserdem noch in vielen anderen Substanzen in gleicher Weise die Blaufärbung hervorgerufen werden konnte. Besonders sind es alle Verbindungen, welche pflanzliches Eiweiss enthalten, z. B. Mandelmilch, gekochte Kartoffeln, Reisbrei, Arrowroot. Kein Farbstoff wurde hingegen auf tierischem Eiweiss, wie Hühnereiweiss, Blutserum, gebildet. In einer Mischung von milchsaurem Ammon und Cohn'scher Nährlösung konnte gleichfalls eine Bildung des blauen Farbstoffes beobachtet werden.

Bei den Untersuchungen über die Abhängigkeit dieses Organismus von äusseren Verhältnissen, wie Licht, Sauerstoff der Luft und Temperatur, stellte Neelsen fest, dass ersteres vollkommen ohne Einwirkung auf den Verlauf des Prozesses der Farbstoffbildung, der Sauerstoff der Luft hingegen durchaus notwendig sei. Bei Abschluss der Luft findet keine Weiterbildung statt und infolge dessen auch keine Pigmentbildung. Die Einwirkung der Temperatur endlich ist ohne auffälligen Einfluss, solange es sich nicht um Wärme- oder Kältegrade handelt, welche die Entwickelung des Organismus überhaupt hindern.

Den Prozess der Blaufärbung fasst Neelsen als Symptom einer eigentümlichen Zersetzung auf und bringt denselben in engen Zusammenhang mit der Milchsäurebildung einerseits und dem Zustand des Caseins andererseits. Die Farbstoffbildung tritt erst dann ein, wenn die Milch einen bestimmten Säuregrad erreicht hat, doch wird merkwürdiger Weise eine Zunahme der Säure über diesen Grad hinaus niemals beobachtet. Das infolge der sauren Reaktion der Milch ausgeschiedene Casein wird späterhin, je mehr die Bläuung fortschreitet, wieder gelöst. Bei diesem Prozess entwickelt sich nebenbei eine reichliche Menge Kohlensäure.

Der blaue Farbstoff ist nicht an die Bakterien gebunden, sondern im Serum selbst gelöst. In Wasser und Glycerin ist derselbe löslich, in allen anderen Lösungsmitteln unlöslich. Wegen seiner Leichtzersetzlichkeit gelingt es nicht, denselben rein zu erhalten. Gegen Säuren ist er beständig, Ammoniak hingegen ruft einen etwas

violetten Ton, kohlensaures oder kaustisches Kalium oder Natrium eine schön rosarote Färbung hervor, die jedoch beim Ansäuern sofort wieder in blau übergehen. Der Farbstoff verhält sich mithin gerade umgekehrt wie der Lackmusfarbstoff. 12 bis 24stündige Einwirkung von kaustischem Kalium bewirkt eine ziegelrote Farbe mit schwacher Fluorescenz, und Säure stellt dann die blaue Farbe nicht wieder her. Eine alkalische, ziegelrote Lösung langsam verdunstet, scheidet ein gelbrotes, amorphes, in Alkohol unlösliches, in Wasser hingegen lösliches Pulver ab.

Das spektroscopische Verhalten des Farbstoffes, besonders das der rosaroten Lösung ist sehr charakteristisch. Gerade hierdurch konnte Neelsen die nahe Verwandtschaft des Pigmentes mit den Anilinfarbstoffen feststellen, zugleich aber auch die Ansicht Erdmann's (29, 99, 385) widerlegen, dass der Farbstoff mit Triphenyl-rosanilin identisch sei.

Die Bildung des Pigments erklärt er als synthetischen[6] Vorgang im Gegensatz zu Erdmann, der einen analytischen Prozess annimmt. Der Farbstoff wird hierbei aus Milchsäure gebildet. Nötig ist ferner noch Ammoniak, das bei der Zersetzung des Caseins erhalten wird. Zu dieser Bildung ist Sauerstoff absolut notwendig.

Bacterium syncyaneum soll, abgesehen von seiner Fähigkeit Farbstoff zu bilden, noch Milchzucker zu Milchsäure vergähren können.

Im Jahre 1883 beschäftigte sich dann Hüppe (3, 2, 355) eingehend mit dem Erreger der blauen Milch, und es gelang ihm leicht mittelst des Koch'schen Plattenverfahrens den Organismus rein zu erhalten. Er weist zunächst nach, dass die Annahme Neelsen's von verschiedenen Entwicklungszyklen des Bakteriums, in denen bald Gonidien, bald Sporen, bald Chroococcusformen abwechseln sollten, lediglich auf unreine Kulturen zurückzuführen sei.

Über die Lebensäusserungen des von ihm isolierten Organismus machte Hüppe folgende Angaben:

In einer Gelatinestichkultur entsteht eine schön grüne Farbe, welche die ganze Kolonie umgiebt und an der Einstichstelle am intensivsten ist. Später ist eine leichte Braunfärbung der Kultur zu beobachten. Die grüne Färbung ist jedoch nur in alkalischer Fleischwasserpeptongelatine so schön sichtbar. Ist hingegen die Reaktion des Nährbodens mehr neutral, so ist eine mehr gelbgrüne Farbe zu beobachten.

[6] Pasteur wies zuerst nach, dass niedere Pflanzen die Fähigkeit besitzen, aus einfachen Verbindungen Eiweissstoffe synthetisch darzustellen (Vergl. „Alkoholgährung" deutsch von Victor Griessmaier, Augsburg 1871.)

Auf neutraler Milchserumgelatine endlich zeigt sich eine matt graublaue Farbe.

In neutraler Milch ist gleichfalls nur eine schiefergraue Farbe zu beobachten, die langsam nach unten hin vordringt. Ist die Reaktion der Milch schwach sauer, so ist die auftretende Färbung mehr himmelblau. In beiden Nährmedien gehen schliesslich beide Farben in schmutzig grau über. Die Milch ist hierbei nicht geronnen, hat auch nicht an Acidität zugenommen, zeigt vielmehr eine schwach alkalische Reaktion. Setzt man jetzt irgend eine Säure zu, so geht der mattgraue Ton sofort in blau über.

Auf Grund quantitativer Bestimmungen des Zuckergehaltes ungeimpfter Milch und solcher, die durch das Bakterium graublau geworden, beweist dann der Verfasser, dass zur Bildung des Farbstoffes nicht der Milchzucker resp. die daraus entstandene Milchsäure verwendet würde, wie Neelsen annimmt, sondern das Casein als einzige Quelle anzusehen sei.

Ferner spricht Hüppe dem Organismus die Fähigkeit ab, in Milch Säuerung hervorzurufen, und nimmt an, dass derselbe vielmehr in dem sauren Medium auf Kosten der Säure sich ernähre und auf diese Weise die sauere Reaktion des Nährbodens in eine weniger saure, dann in eine neutrale und schliesslich in eine alkalische überführe. Die Fehler Neelsen's will er auf unreine Kulturen zurückführen.

Ausser in den bisher erwähnten Nährmedien und der von Neelsen vorgeschlagenen Nährlösung verwendet Hüppe noch einige andere, complicierter zusammengesetzte Kulturflüssigkeiten und zwar zunächst von folgender Zusammensetzung:

Weinsaures Ammonium	0,5 —1	p. Ct.
Saures Kaliumphosphat[7]	0,2 —0,5	„ „
Magnesiumsulfat	0,05—0,25	„ „
Chlorcalcium	0,01—0,125	„ „

Sämtliche Nährlösungen besassen mithin saure Reaktion.

In diesen tritt einige Tage nach der Impfung zuerst ein bläulicher bis violetter Ton auf. Später ist dann direkt an der Oberfläche die grüne Farbe zu beobachten, die nach weiteren zwei Wochen in der ganzen Kulturflüssigkeit sichtbar ist. Zuletzt ist die Flüssigkeit gelbbraun gefärbt und zeigt deutlich alkalische Reaktion.

Auf Grund dieses Verhaltens schreibt Hüppe dem Organismus die Fähigkeit zu, aus weinsaurem Ammonium nicht nur den blauen,

[7] Formel: $K H_2 P O_4$.

sondern auch den grünen Farbstoff bilden zu können. Von dem letzteren nimmt er an, dass er eine niedere Oxydationsstufe des blauen Pigmentes sei und giebt an, dass es ihm gelungen sei, den grünen Farbstoff durch Oxydationsmittel in den blauen überzuführen.

Ausser in den vorstehenden Nährlösungen konnte er noch in Asparagin, Leucin und Harnstoff das Auftreten des grünen Farbstoffes beobachten.

Als bestes Medium zur Bildung des blauen Farbstoffes erschien ihm eine Nährlösung, die als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle an Stelle des weinsauren Ammons das milchsaure Ammon enthielt. Ausnahmsweise soll jedoch auch hier schon in saurer Lösung der grüne Farbstoff sichtbar sein. Sonst zeigt der Organismus ganz das gleiche Verhalten wie in weinsaurem Ammoniak. Die anfangs himmelblaue Lösung färbt sich später grün bis gelbbraun und reagiert dann nicht mehr sauer, sondern alkalisch.

Bei der Bildung des blauen Farbstoffes nimmt Hüppe wie Neelsen einen synthetischen Prozess an. Bezüglich seiner Constitution soll der Farbstoff ein Salz sein, bei dem Ammoniak die Base, hingegen eine Säure der Fettreihe die Säure ist. Der gleichen Ansicht ist Scholl (30, 7, 807).

Ausser der Arbeit von Hüppe veröffentlichte Heim (31, 5, 518) im Jahre 1889 seine Resultate über blaue Milch, die jedoch bezüglich des biologischen Verhaltens des Bacillus nichts neues bringen und im wesentlichen überhaupt nur eine Bestätigung der von Hüppe gefundenen Thatsachen sind.

Zu erwähnen ist ferner noch ein Vortrag von Gessard[8], in welchem derselbe die Eigenschaften des Bacillus des blauen Eiters und der blauen Milch mit einander vergleicht und dabei hauptsächlich die Farbstoffproduktion und die Züchtung verschiedener Raçen berücksichtigt.

Auch Bacillus fluorescens putidus und Bacillus fluorescens liquefaciens wurden dann gleichfalls bezüglich ihres Farbstoffs untersucht. Gessard (26, 1890) identificiert denselben mit dem von Bacillus pyocyaneus gebildeten, da diese Arten wie der Erreger des blauen Eiters in reiner Peptonlösung den grünen Farbstoff nicht bilden. Hoffa (32, 1891, 247) untersuchte dann im Jahre 1891 eingehender den von Bacillus fluorescens liquefaciens gebildeten Farbstoff. Er isolierte denselben nach einem modifizierten Brieger'schen Verfahren und erhielt ein weisslich graues Pulver, dessen wässrige

[8] Gessard, Microbes chromogènes. Plus bleu et Lait bleu. Paris, May und Motteroy (Revue scientifique, 1892, Nr. 19, p. 577).

Lösung mit Kalilauge oder Ammoniak schön grün fluoresciert. Auf Grund der letzteren Eigenschaft des Farbstoffes und weil Hoffa den Organismus als Alkalibildner erkannt hatte, nimmt er an, dass die in der Kultur auftretende grüne Fluorescenz auf das vom Bacillus produzierte Ammoniak zurückzuführen sei.

Galeotti (33, 46, 3, 261) nimmt ein Jahr darauf bei Bacillus fluorescens liquefaciens trotzdem einen flüssigen Farbstoff an und will hierdurch die Diffussion desselben in dem Nährsubstrate erklären. Das Gleiche nimmt er überdies auch bei Bacillus pyocyaneus und ähnlichen Bakterienarten an.

Über den Farbstoff der übrigen fluorescierenden Arten sind nur einige allgemeine Angaben zu finden. So erwähnt Nägeli[9] bei seinen Untersuchungen über die Ernährung der niederen Pilze, dass er in vielen Flüssigkeiten eine hellgrüne Fluorescenz beobachtet hätte. Da hier die Färbung an der Oberfläche der Kultur beginnt und nach unten zu fortschreitet, ist er der Ansicht, dass dieser Farbstoff aus einer bei der Assimilation entstehenden farblosen Verbindung durch nachträgliche Oxydation entstünde.

Zum Schluss möchte ich noch einmal auf die Arbeit Gessard's (26, 1892, 80) über die Abhängigkeit der Farbstoffproduktion von der Zusammensetzung des Substrates hinweisen, die sich zwar hauptsächlich mit Bacillus pyocyaneus beschäftigt, wobei jedoch der Verfasser die an diesem gefundenen Resultate auf die ganze Gruppe der fluorescierenden Bakterien überträgt. Busse (11, 14, 696), der die Gessard'sche Arbeit in dem Centralblatt für Bakteriologie referierte, erwähnt hierbei, dass nach seinen Versuchen die übrigen fluorescierenden Arten gleichfalls Phosphorsäure zur Bildung des Pigments nötig hätten, doch bezweifelt er die Annahme Gessard's, dass aus der Abwesenheit des Farbstoffes auch auf die Abwesenheit von Phosphat zu schliessen sei.

Die Verschiedenheiten der Ansichten über die gefärbte Stoffwechselprodukte des Bacillus pyocyaneus, sowie die nahezu vollständige Ignorierung der anderen fluorescierenden Arten veranlasste mich, der Gruppe dieser so interessanten Organismen eine erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken. Ich stellte es mir zur Aufgabe, nicht nur Einzelnes nachzuuntersuchen, sondern auch ganz besonders eine grössere Anzahl der fluorescierenden Arten nach einheitlichen Gesichtspunkten eingehend auf die Verhältnisse zu prüfen, die auf die Bildung des fluorescierenden Farbstoffes Bezug haben. Bei dem

[9] Nägeli, Untersuchungen über niedere Pilze 1882. Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen.

grossen Umfang der Untersuchung und der Schwierigkeit, von allen fluorescierenden Arten frisches Material zu beschaffen, wurde im voraus darauf verzichtet, diese Arbeit auf sämtliche fluorescierenden Arten auszudehnen; es wurden vielmehr nur einige der besser bekannten Arten ausgewählt und zwar:

Bacillus fluorescens tenuis,	Zimmermann[10]
„ „ putidus,	Flügge
„ „ albus,	Zimmermann
„ erythrosporus,	Eidam
„ viridans,	Symmers
„ pyocyaneus,	Ernst (β-Var.)
„ „	Körber
„ „	Gessard 1.
„ „	„ 2.
„ „	„ 3.
Bacterium syncyaneum α.	
„ „ β.	

Hierzu möchte ich erwähnen, dass Bacillus pyocyaneus Gessard 3 infolge jahrelanger Kultur auf Agar seine Farbstoffproduktion vollständig verloren hatte. Er gelangte trotzdem zur Untersuchung, um zu beobachten, ob derselbe nicht vielleicht in dem einen oder andern Nährboden wieder zur Farbstoffbildung angeregt werden könnte.

Die beiden Raçen des Bacillus der blauen Milch unterscheiden sich in der Weise, dass der erste (die α-Var.) vollständig normal beide Farbstoffe bildet, während der letztere (die β-Var.) nur noch im Stande ist das stahlblaue Pigment zu producieren. Diese Änderung bewirkte eine 8jährige fortgesetzte Kultur des letzteren auf Agar.

Sämtliche Bakterien, die zur Untersuchung gelangten, wurden mir von Herrn Professor Dr. Migula gütigst zur Verfügung gestellt.

---

[10] Der Name hinter den verschiedenen Arten giebt an, von wem die Kultur stammte.

Methoden der Untersuchung.

Da ich mir zur Aufgabe gemacht habe, festzustellen, ob die bei der Kultur eines fluorescierenden Bakteriums auftretenden Färbungen thatsächlich verschiedenen Farbstoffen zuzuschreiben seien oder einem einzigen, welcher nur infolge wechselnder Kulturbedingungen äusserlich verschieden erscheint, musste ich in erster Linie das Auftreten der Pigmente in den einzelnen Nährmedien genau beobachten. Zu diesem Zwecke legte ich Gelatine- und Agar-Stich- und Strichkulturen, Bouillon- und Kartoffelkulturen an und beobachtete nicht nur, was für Farbstoffe, sondern auch in welcher Reihenfolge dieselben erschienen.

Die zu den Kulturen notwendige Bouillon enthielt in 1 Liter Fleischwasser — dieses wurde durch Auskochen von $^1/_2$ Ko. fein gemahlenen Rindfleisches mit 1 Liter Wasser im Dampfsterilisationsapparat erhalten — 10 gr Pepton und je 5 gr. Traubenzucker und Kochsalz, die Gelatine ausserdem noch 50 gr. weisse Gelatine und das Nähragar anstatt letzterer 20 gr Agar-Agar. Die Neutralisation sämtlicher 3 Nährmedien geschah nicht wie allgemein üblich mit einer concentrierten Natriumcarbonatlösung, sondern mit Normal-Kalilauge.[1] Ferner wurde, nachdem dies geschehen war, mit weiteren 5 ccm dieser Normallösung schwach alkalisch gemacht. Diese Abweichung hatte den Zweck, Nährsubstrate von genau bekanntem und stets gleichem Alkaligehalte zu erhalten und ich wurde zu diesem Verfahren deswegen veranlasst, weil ich im Laufe meiner Arbeit die grosse Bedeutung grösserer oder geringerer Alkalität für das Auftreten der verschiedenen Fluorescenzerscheinungen erkannte. Die Kartoffelkulturen legte ich nach der von Koch (3, 1, 169) vorgeschlagenen Methode an. Nach dem gründlichen Reinigen der un-

[1] 56 gr Kaliumhydroxyd in 1 Liter enthaltend.

geschälten Kartoffeln wurden dieselben mit 1‰ Sublimatlösung behandelt und nach dem Abspülen mit Wasser im Kartoffelkochtopf sterilisiert. Die mit sterilem Messer in zwei Hälften geteilten Kartoffeln wurden in der feuchten Kammer aufbewahrt und in dieser auch nach dem Impfen von Zeit zu Zeit die Kultur beobachtet.

Nachdem ich durch vorstehende Versuche festgestellt hatte, dass in Gelatine, Agar und Bouillon die gleichen Farbstoffe auftraten, auf Kartoffel dagegen eine scheinbare Abweichung zu beobachten war, wandte ich zunächst meine Aufmerksamkeit den in den drei ersten Nährmedien entstehenden Farbstoffen und hier wieder hauptsächlich der Gelatinekultur zu. Letzteres geschah deswegen, weil die Erscheinung der Farbstoffe in keinem anderen Nährboden mit solcher Deutlichkeit wie hier zu beobachten war.

Bevor ich jedoch die verschiedenen hier sich zeigenden Färbungen selbst untersuchte, richtete ich meine Aufmerksamkeit auf das eigentümliche Auftreten der Farbstoffe in der Gelatinestrichkultur. Hierbei liessen sich stets zwei grosse Unterschiede erkennen. Die blaue Fluorescenz trat stets an der Stelle, an welcher die Strichkultur am breitesten war, mithin in ganz normaler Weise auf, während die grüne Fluorescenz, sowie die damit verbundene Gelbfärbung der Gelatine, an der dünnsten Gelatineschicht ihren Anfang nahm. Bei dem späteren Auftreten der Orangefärbung des Substrats verhält es sich wie bei dem Erscheinen des gelben Farbstoffes. Da an diesem Teile der Kultur lange nicht die starke Ausbreitung über die Gelatine stattfinden konnte, wie weiter unten, mithin diese eigentümliche Erscheinung vollständig unabhängig von der Grösse des Wachstums war, musste dieselbe auf rein äusserliche Verhältnisse zurückgeführt werden. Als solche konnte sowohl die dünnere Gelatineschicht, wie die grössere dort befindliche Luftmenge angesehen werden. Um dies zu erforschen, wurden Strichkulturen auf horizontal erstarrter, überall gleichdicker Gelatine angelegt, und zwar ein Versuch, bei dem die Schicht überall eine Dicke von 1 cm^2, und ein anderer, bei dem dieselbe nur eine solche von 3 mm^3 hatte. Die erste Kultur wurde in einem grossen Reagensglase angelegt, dessen Gelatine zuerst verflüssigt und wagrecht zum Erstarren gebracht wurde. Die andere hingegen wurde in der Weise ausgeführt, dass eine entsprechende Menge Gelatine einfach in eine Kulturschale ausgegossen und nach ihrer Erstarrung im Strich geimpft wurde.

---

[2] Bei den späteren Versuchen bezeichnete ich die Kultur kurz mit Reagensglaskultur.

[3] Aus demselben Grunde wie 2. später als Plattenkultur angeführt.

Bei der Anlage der Kultur wurde stets beachtet, dass der Impfstrich überall gleichstark ausgeführt wurde.

Nach Ausführung dieser Versuche trat ich nun der Farbstoffproduktion selbst näher. Da trotz der überaus grossen Zahl Pigmentbakterien nur wenige[4] bekannt sind, die in der That mehrere verschiedene Farbstoffe producieren, hielt ich es im Voraus für unwahrscheinlich, dass alle diese so zahlreich in ein und derselben Kultur auftretenden Färbungen verschiedenen, gefärbten Stoffwechselprodukten zuzuschreiben seien. Diese Ansicht wurde durch die später zu erörternde Art und Weise des Auftretens der grünen Fluorescenz bestärkt.

Die nach einander auftretenden Färbungen konnten auf eine Oxydationserscheinung zurückgeführt werden. Nach dieser Annahme würde der Organismus zunächst ein gefärbtes oder ungefärbtes Stoffwechselprodukt bilden, aus welchem dann durch fortschreitende Oxydation die einzelnen Pigmente entstünden. Für diese Annahme spricht die Ansicht Nägeli's, der bei den fluorescierenden Bakterien zuerst die Bildung von Leukofarbstoff annimmt. Desgleichen nehmen Ledderhose, Kunz und andere auch bei Bacillus pyocyaneus an, dass zuerst eine farblose Verbindung entstünde, die erst durch den Luftsauerstoff in Farbstoff übergeführt würde. Der direkte Weg, den Organismus unter Ausschluss des Sauerstoffs wachsen zu lassen — in diesem Fall hätte kein Pigment gebildet werden dürfen —, konnte nicht eingeschlagen werden, da die fluorescierenden Bakterien überhaupt nur bei Luftzutritt wachsen und Lebensäusserungen zeigen. Infolge dessen suchte ich das Gleiche — Ausschluss des Luftsauerstoffs — indirekt zu erreichen durch Zusatz reducierender Substanzen zur Nährgelatine, die jede Spur Sauerstoff absorbieren und infolge dessen eine Oxydation, wenn auch nicht vollständig verhindert, so doch hinausgezogen hätten. Als hierzu geeignete kräftige Reduktionsmittel benutzte ich die für die Kultur der Anaeroben empfohlenen Körper und zwar den von Liborius (7, 1, 168) angewandten Traubenzucker und die von Kitasato und Weyll (7, 8, 41) erprobten: Resorcin, ameisensaures Natrium und Hydrochinon. Diese Substanzen wurden erst in der fertigen Nährgelatine aufgelöst. Traubenzucker setzte ich 2 und 4%, Resorcin 0,075%, ameisensaures Natrium 0,25% und Hydrochinon 0,1% derselben zu.

Es konnten aber auch entweder der Nährboden selbst oder darin auftretende Stoffwechselprodukte, die durch Zersetzung desselben

[4] Zwei verschiedene Pigmente bildet Bacillus lactis erythrogenes, Bacillus fluorescens aureus und Bacterium syncyaneum.

gebildet wurden, verändernd auf den ursprünglich gebildeten Farbstoff einwirken.

Um zu erforschen, ob das Substrat als solches in irgend einer Weise die zuerst sichtbare, blaue Färbung beeinflusst, wurde folgender Versuch ausgeführt. Auf schräg erstarrter Gelatine wurde eine Strichkultur angelegt. Als deren Entwicklung soweit gediehen war, dass in der ganzen Kultur die blaue Fluorescenz auftrat, wurde die Luft durch Wasserstoffgas verdrängt, das Kulturgläschen vorsichtig mit Kautschukstopfen verschlossen und zur Sicherheit mit Paraffin verkittet. Trat bei diesem Experiment irgend eine Veränderung der blauen Fluorescenz ein, konnte dieselbe nur auf Rechnung des Substrates geschrieben werden, da durch den Ersatz der Luft durch den indifferenten Wasserstoff nicht nur jede Oxydation ausgeschlossen war, sondern auch infolge des unterdrückten Wachstums die Bildung irgend eines Stoffwechselproduktes unmöglich geworden war.

Für die dritte Möglichkeit, dass nämlich die Fluorescenzerscheinungen von gewissen Stoffwechselprodukten abhängig seien, musste in erster Linie untersucht werden, ob sich die Reaktion des Nährsubstrates bei der Entwicklung der Kolonie in irgend welcher Weise ändere. Trat dieser Fall ein, so musste versucht werden, ob man durch vorhergehende Änderung der Reaktion des Nährmediums irgend einen Einfluss auf die Bildung der Fluorescenz ausüben konnte, oder ob eine Änderung derselben durch nachträgliches Zufügen von Säure oder Alkali zu den bereits gewachsenen Kulturen zu erreichen sei. Erst wenn man aus diesen Versuchen die Überzeugung gewonnen hätte, dass die Fluorescenzerscheinungen unabhängig von der Reaktion des Substrates seien, würden dann andere Stoffwechselprodukte mit in den Kreis der Untersuchung zu ziehen gewesen sein.

Die Einzelheiten der hierher gehörigen Versuche sind im speciellen Teil ausführlich angegeben, da sie sich von den Ergebnissen nicht gut trennen lassen und eine Wiederholung vermieden werden sollte.

Alle bisher erwähnten Versuche beschäftigten sich nur mit den in Gelatine, Agar und Bouillon auftretenden Färbungen. Nach Ausführung derselben wandte ich mich der Kartoffelkultur zu und suchte die Gründe für das veränderte Wachstum und die unbedeutende Farbstoffproduktion kennen zu lernen. In Betracht kamen hierbei sowohl die veränderten Nährstoffe, als auch vor allem die saure Reaktion des Substrates. Um zu erforschen, ob letzterer Eigenschaft allein diese grossen Abweichungen zuzuschreiben seien, legte ich anstatt auf alkalischer auf saurer Gelatine Kulturen an. Zeigte sich hier dann das gleiche Wachstum und dieselbe Pigmentbildung wie

auf der Kartoffel, so hatte nur die freie Säure diese Veränderungen bedingt. Die Herstellung dieser sauren Gelatine geschah auf die gleiche Weise wie die der schwach alkalischen. Zum Schluss wurde nur nach genauer Neutralisation an Stelle von weiterem Alkali 20 Tropfen concentrierte Schwefelsäure (spez. Gew. 1,840) zugesetzt.

Einen weiteren Versuch, um die Einwirkung freier Säure auf den gebildeten fluorescierenden Farbstoff kennen zu lernen, führte ich in der Weise aus, dass ich zugleich mit dem Pigmentbakterium einen Säurebildner kultivierte, mithin die gebildete Säure gewissermassen in statu nascendi einwirkte. Als solcher wurde stets Bacillus acidi lactici verwendet, da derselbe ungefähr ein ebenso gutes und rasches Wachstum wie die meisten fluorescierenden Bakterien zeigt. Die Anlage einer derartigen Kultur geschah in der Anordnung, dass auf schräg erstarrter Gelatine in der Mitte ein Impfstrich des fluorescierenden Organismus, rechts und links davon je einer des Säurebildners geführt wurde. Die dabei in Betracht kommenden Einzelheiten, besonders die Stärke der Impfstriche und ihr gegenseitiges Längenverhältnis sind im experimentellen Teil eingehend behandelt.

Bevor ich jedoch zu den Kulturen in Nährlösungen übergehe, möchte ich erwähnen, dass die vorstehenden Versuche nicht immer genau in der eben beschriebenen Weise ausgeführt werden konnten. Es lag dies daran, dass auch Gelatine verflüssigende Arten zur Untersuchung gelangten. Bei diesen musste selbstverständlich eine Modifikation der Experimente angewandt werden. An Stelle der Gelatinestrichkultur musste oft eine Agar-Strichkultur, an Stelle einer Strich- eine Stichkultur treten.

Nachdem ich durch meine seitherigen Versuche die Beziehungen der einzelnen von einem fluorescierenden Bakterium producierten Farbstoffe zu einander feststellen konnte, wandte ich mich der Beantwortung folgender Frage zu: In welchem Zusammenhang steht die Pigmentbildung mit der Entwicklung des Organismus, sind beide Begriffe eng zusammengehörig, oder ist erstere von rein nebensächlicher Bedeutung für das Leben der Bakterienzelle und lediglich von der Zusammensetzung des Substrates abhängig?

Da in reinem Fleischwasser die Fluorescenz in gleicher Weise wie in der zusammengesetzten Bouillon auftritt, musste ein einfaches zusammengesetztes Nährmedium, dessen einzelne Bestandteile in chemischer Hinsicht genau bekannt waren, gewählt werden. Bei der Wahl dieser Nährlösung hielt ich mich an die Untersuchungen Nägeli's über die Ernährung dieser niedersten Pflanzen. Bei der Zusammensetzung der verschiedenen Nährmedien verwendete ich stets

die gleichen Nährsalze und variierte nur die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Dies geschah in erster Linie um festzustellen, welche organische Verbindung sich am besten als Nährstoff für die einzelnen Organismen bewährt, dann auch um zu beobachten, ob die fluorescierenden Arten gegen die einzelnen organischen Nährstoffe sich gleich verhalten, oder ob Unterschiede zu konstatieren seien.

Die Nährlösungen enthielten folgende Bestandteile:

Nährlösung mit Asparagin: Asparagin 0,7; Kaliumphosphat[5] 0,1; Magnesiumsulfat 0,04; Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung mit bernsteinsaurem Ammon: bernsteinsaures Ammon 1,0; Kaliumphosphat 0,1; Magnesiumsulfat 0,04; Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung mit Harnstoff[6] und Mannit: Harnstoff 0,4; Mannit 0,5; Kaliumphosphat 0,1; Magnesiumsulfat 0,04; Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung mit Harnstoff und Traubenzucker: Harnstoff 0,4; Traubenzucker 0,5; Kaliumphosphat 0,1; Magnesiumsulfat 0,04, Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung mit citronensaurem Ammon: citronensaures Ammon 0,5; Kaliumphosphat 0,05; Magnesiumsulfat 0,01; Chlorcalcium 0,005; Wasser 100,0.

Nährlösung mit weinsaurem Ammon: weinsaures Ammon 0,5; Kaliumphosphat 0,05; Magnesiumsulfat 0,01; Chlorcalcium 0,005; Wasser 100,0.

Nährlösung mit buttersaurem Calcium: buttersaures Calcium 0,5; Ammoniumchlorid 0,5; Kaliumphosphat 0,05; Magnesiumsulfat 0,01; Wasser 100,0.

Nährlösung mit milchsaurem Ammon: Die Nährlösung besitzt die gleiche Zusammensetzung wie die mit citronensaurem Ammon, nur ist an Stelle des citronensauren das milchsaure Ammon getreten.

Nährlösung mit ameisensaurem Ammon: Ameisensaures Ammon 0,3; Kaliumphosphat 0,05; Magnesiumsulfat 0,01; Chlorcalcium 0,005; Wasser 100,0.

Nach Ausführung dieser Versuche wandte ich mich meiner eigentlichen Aufgabe zu, festzustellen, welche Nährsalze zum Auftreten des Farbstoffes absolut notwendig sind, und ich hielt mich bei dem Variieren der verschiedenen Nährsalze an die von Gessard (26, 1892) gebrauchte Nährlösung, um unter den gleichen Bedingungen wie dieser zu arbeiten.

---

[5] von der Constitution K_2HPO_4 mithin das neutrale Salz.

[6] Harnstoff ist nur Stickstoffquelle.

Die Zusammensetzung der Nährlösungen war folgende:

Nährlösung ohne Chlorcalcium: Bernsteinsaures Ammon 1,0; Kaliumphosphat 0,1; Magnesiumsulfat 0,04; Wasser 100,0.

Nährlösung ohne Magnesiumsulfat: Bernsteinsaures Ammon 1,0; Kaliumphosphat 0,1; Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung ohne Kaliumphosphat: Bernsteinsaures Ammon 1,0; Magnesiumsulfat 0,04; Chlorcalcium 0,02; Wasser 100,0.

Nährlösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Bernsteinsaures Ammon 1,0; Kaliumphosphat 0,1; Wasser 100,0.

Bei der Variation verschiedener Mengen Kaliumphosphat wurde von folgender Lösung ausgegangen: Wasser 100,0; bernsteinsaures Ammon 1,0; Magnesiumsulfat 0,04. Hierzu wurden wechselnde Mengen Kaliumphosphat zugefügt und zwar: 0,00125%; 0,0025%; 0,005%; 0,01%; 0,02%; 0,025%; 0,05%; 0,1%.

Bei der Variation des Magnesiumgehaltes war die Zusammensetzung der Flüssigkeit, von welcher ausgegangen wurde, folgende: Wasser 100, bernsteinsaures Ammon 1,0, Kaliumphosphat 0,1. Dieser Lösung wurden nachstehende Mengen Magnesiumsulfat zugesetzt: 0,0025%; 0,005%; 0,0075%; 0,01%.

Zur Darstellung der einzelnen Lösungen ist noch Folgendes zu erwähnen. Da die chemische Reinheit der zur Verwendung kommenden Nährsalze ein Haupterfordernis bei diesen Versuchen ist, wurden dieselben zuerst sorgfältig hierauf geprüft.

Die Bereitung der Nährlösungen selbst geschah auf die Weise, dass jeder Bestandteil für sich aufgelöst wurde, worauf dann erst in grösster Verdünnung die Mischung der einzelnen Salzlösungen erfolgte. Dies hatte den Zweck, die Entstehung eines Niederschlags möglichst zu verhindern oder, wenn dies doch geschah, denselben wenigstens in feiner Verteilung zu erhalten, in welcher Form er am besten von den Organismen assimiliert werden kann.

Die Kultur geschah in Kölbchen von ca. 150 cm Inhalt. Diese wurden etwa zur Hälfte gefüllt, mit Wattepfropf verschlossen, dann im Dampfsterilisationsapparat an drei nach einander folgenden Tagen je 20 Minuten sterilisiert.

Zum Schluss wurden noch die von den einzelnen fluorescierenden Bakterien producierten Farbstoffe isoliert, um sowohl die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines jeden zu erforschen, als auch die verschiedenen Pigmente mit einander vergleichen zu können. Von den verschiedenen Varietäten des Bacillus pyocyaneus wurde jedoch nur die von „Ernst“ bezüglich ihrer Pigmentbildung untersucht. Bei Bacterium syncyaneum beschränkte ich mich auf die Isolierung des fluorescierenden Pigments, während ich bezüglich

des stahlblauen Farbstoffes infolge seiner Leichtzersetzlichkeit keine weiteren Versuche anstellte.

Als Nährmedium wurde nicht wie bisher allgemein üblich Bouillon, Agar-Agar oder Nährgelatine, sondern eine der vorerwähnten Nährsalzlösungen verwendet. Nur in diesem Falle sind alle Verhältnisse genau bekannt und es ist infolge dessen möglich, eine Methode der Isolierung auszuarbeiten, durch die man den Farbstoff möglichst rein erhält. Als Kulturflüssigkeit diente stets die Nährlösung, in welcher der Organismus die beste Farbstoffproduktion zeigte. Die Lösung für sämtliche fluorescierende Arten, mit Ausnahme von Bacterium syncyaneum, enthielt in 1 Liter destillierten Wassers 10 gr bernsteinsaures Ammon und 0,4 gr. Magnesiumsulfat. Die nötige Kaliumphosphatmenge war hingegen bei den einzelnen Organismen verschieden und zwar für Bacillus fluorescens tenuis und Bacillus fluorescens putidus 1 gr., für Bacillus fluorescens albus, Bacillus erythrosporus, Bacillus pyocyaneus Ernst 0,25 gr und für Bacillus viridans 2 gr Kaliumphosphat auf 1 Liter obiger Nährlösung.

Die Kulturflüssigkeit für Bacterium syncyaneum α enthielt in 1 Liter destillierten Wassers Asparagin 7 gr, Kaliumphosphat 1 gr, Magnesiumsulfat 0,04 gr. Zu dieser Abweichung wurde ich deshalb veranlasst, weil in dieser alkalischen Nährlösung das fluorescierende Pigment allein gebildet wird.

Die einzelnen Arten wurden in diesen Nährflüssigkeiten so lange — meist 8—14 Tage — kultiviert, bis das fluorescierende Pigment in genügender Menge gebildet war.

Jedoch nicht nur aus alkalischer sondern auch aus saurer Nährlösung wurde das Pigment isoliert. Es geschah dies, um festzustellen, ob in saurem Nährmedium der gleiche Farbstoff entsteht wie bei alkalischer Reaktion. Es wurden dieselben Nährlösungen verwendet, nur waren denselben auf 1 Liter 20 Tropfen concentrierte Schwefelsäure zugesetzt. Die von Bacterium syncyaneum gebildeten Farbstoffe wurden aus später anzuführenden Gründen nicht untersucht. Zu den Kulturen in sauren Nährflüssigkeiten ist noch zu erwähnen, dass das Kulturgefäss täglich öfters umgeschüttelt wurde, damit die Reaktion der Flüssigkeit während der Dauer der Kultur in allen Schichten stets eine saure bleibt. Bei Nichtbefolgung dieser Massregel ist in kurzer Zeit in der obersten Flüssigkeitsschicht neutrale und später alkalische Reaktion eingetreten, während der untere Teil noch sauer bleibt.

Als Kulturgefässe kamen grosse Glaskolben zur Verwendung, die nur zur Hälfte gefüllt waren, um eine möglichst grosse Flüssigkeitsoberfläche zu erhalten.

Zur Isolierung der Farbstoffe wurde folgender Weg eingeschlagen:

100 gr. der Kulturflüssigkeit werden mit 200 ccm Alkohol[7] versetzt, tüchtig umgeschüttelt und nach 12stündigem Stehen die ausgeschiedenen eiweissartigen Stoffe abfiltriert. Das klare, schön gelb gefärbte und prachtvoll grün fluorescierende Filtrat wird hierauf in flachen Schalen bei niederer Temperatur auf schwach siedendem Wasserbad möglichst rasch zur Sirupconsistenz eingedampft. Nach weiteren 12 Stunden haben sich wieder organische Substanzen ausgeschieden, und ein Teil der Nährsalze ist auskrystallisiert. Nachdem man durch ein kleines, mit Wasser befeuchtetes Filter filtriert hat, setzt man zu der orangeroten, blau fluorescierenden Flüssigkeit ca. 100 cc. Alkohol unter beständigem Umschütteln hinzu und lässt das Ganze 12 bis 24 Stunden stehen, worauf man filtriert.

Das Filtrat (No. 1) enthält ev. in Alkohol lösliche Farbstoffe und Eiweisskörper, dann sämtliches unzersetztes bernsteinsaures Ammon resp. Asparagin und einen ziemlich grossen Teil der anorganischen Nährsalze. Dasselbe wird wie unten erwähnt weiter behandelt.

Der Niederschlag besteht aus Farbstoff, in Alkohol unlöslichen eiweissartigen Substanzen und anorganischen Nährsalzen. Derselbe wird mit wenig destilliertem Wasser aufgenommen, wenn nötig, filtriert, hierauf mit mehr Wasser auf 30 ccm verdünnt und dann zur weiteren Reinigung mit 2 bis 5 ccm Ammoniumhydroxyd[8] versetzt. Nach ungefähr 2 bis 4stündigem Stehen wird von dem entstandenen Niederschlag, der teils organischer, teils anorganischer Natur ist, abfiltriert, aus dem schön grün fluorescierenden Filtrat zunächst das Ammoniak durch schwaches Erwärmen vertrieben, dann weiter eingedampft und der Farbstoff wieder mit Alkohol gefüllt.

Das Filtrat (Nr. 2) wird mit dem 1. Filtrat (Nr. 1) vereinigt, der Niederschlag hingegen mit 20 ccm Wasser aufgenommen und langsam mit gesättigter Calciumhydroxydlösung[9] in geringem Überschuss versetzt. Hierdurch fällt der Rest der Phosphorsäure als Calciumphosphat, die Schwefelsäure als Calciumsulfat und Kalium wird in Kaliumhydroxyd, das gelöst bleibt, übergeführt. Das Filtrat enthält mithin den Farbstoff, Kaliumhydroxyd und etwas Calciumhydroxyd. Der sirupöse Verdampfungsrückstand hiervon wird wieder mit Alkohol im Überschuss versetzt und nach einigen Stunden filtriert.

---

[7] Hierunter ist stets ein Weingeist verstanden, der in 100 Teilen 96 Raumteile wasserfreien Alkohol enthält.

[8] spez. G. 0,960.

[9] enthält in 100 Teilen 0,112 gr Ca O.

Das Filtrat (Nr. 3) enthält ausser etwas Pigment sämtliches Kaliumhydroxyd. Der Niederschlag besteht ausser geringen Mengen Calciumhydroxyd fast allein aus Farbstoff. Um ihn vollständig zu reinigen, wird er in 20 ccm Wasser aufgelöst und einige Blasen Kohlensäure eingeleitet, dann erwärmt. Hierbei fällt sämtliches Calcium als Calciumcarbonat und das Filtrat stellt eine reine, dunkelorange gefärbte Farbstofflösung dar. Hieraus wird das Pigment durch Eindampfen und Fällen mit Alkohol als schön gelbes Pulver erhalten.

Die Ausbeute hierbei ist, wie sich denken lässt, eine sehr geringe. Aus einem Liter Nährlösung wurden einige Centigramme Farbstoff erhalten.

Ausser diesem in Alkohol unlöslichem Pigment wurde dann noch geprüft, ob auch noch nebenbei ein in Alkohol löslicher Farbstoff gebildet wurde. Hierzu wurden die vorher erwähnten, mit Nr. 1, 2 und 3 bezeichneten, alkoholischen Lösungen verwendet. Dieselben wurden vereinigt, dann vorsichtig bei niederer Temperatur verdunstet. Der Abdampfungsrückstand, wiederholt mit Chloroform extrahiert, gab an dieses keinen Farbstoff ab. Hierauf wurde derselbe Rückstand mit absolutem Alkohol behandelt, sowohl in der Kälte als auch in der Wärme, doch blieb stets das Extractionsmittel ungefärbt und es war mithin kein in Alkohol lösliches Pigment zugegen. Infolge dessen ist die Färbung der ursprünglichen alkoholischen Lösungen auf einen geringen Wassergehalt zurückzuführen, wodurch sich stets etwas Farbstoff lösen konnte, der durch seine grosse Intensität die starke Färbung hervorrief.

Experimenteller Teil.

Bacillus fluorescens tenuis.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Nach 24 Stunden[1] bemerkt man zunächst eine schön himmelblaue Fluorescenz. Sie zeigt sich nicht an der Oberfläche der Gelatine oder direkt unter der Kultur, sondern immer etwas unter derselben im Innern des Substrates. In den nächsten Tagen nimmt diese Fluorescenz stets an Intensität zu und dringt zugleich immer tiefer ins Innere des Nährbodens vor. Diese blaue Farbe ist jedoch nur im auffallenden Licht sichtbar; im durchfallenden Licht hingegen kann die ganze Zeit über keine Spur von Pigment beobachtet werden. Nach ungefähr 6 Tagen beginnt ein grün fluorescierender Farbstoff aufzutreten und zwar, entgegengesetzt dem Auftreten der blauen Fluorescenz, nicht im Innern der Gelatine sondern direkt an der Oberfläche. Zu gleicher Zeit zeigt der Nährboden an dieser Stelle eine intensivere Gelbfärbung. Nur äusserst langsam schreitet diese zweite Färbung in die tieferen Schichten vor. Noch nach 3 Wochen zeigen die untersten Teile der Gelatine die himmelblaue Fluorescenz. Nach einigen Wochen beginnt der Nährboden sich von der Oberfläche her dunkler zu färben. Es tritt an Stelle des gelben ein orange- bis dunkelroter Farbstoff und an Stelle der moosgrünen Fluorescenz eine dunkelgrüne. In sehr alten Kulturen ist die Gelatine tieforange gefärbt und zeigt im auffallenden Licht betrachtet eine dunkelgrüne Fluorescenz.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Je nach der Menge der übergeimpften Keime tritt entweder am 2. oder erst am 3. Tage die himmelblaue Fluorescenz auf. Die Stelle, an welcher sie sich zuerst zeigt, ist verschieden je nach der Anlage der Strichkultur. Besitzt dieselbe in ihrem ganzen Verlauf die gleiche Stärke, so zeigt sich auch das Pigment in der ganzen Kultur überall zu gleicher

[1] Sämtliche Kulturen wurden bei einer Temperatur von 19° C gezüchtet.

Zeit. Ist jedoch an einer Stelle eine grössere Anzahl von Individuen vorhanden, so tritt, da die Ausbreitung des Impfstriches hier eine viel raschere ist, auch hier zuerst die blaue Fluorescenz auf. Der Farbstoff ist bei der Gelatine-Stichkultur etwas im Innern des Nährbodens sichtbar. 2 bis 3 Tage bleibt diese blaue Fluorescenz allein bestehen und dringt in dieser Zeit langsam tiefer in das Substrat vor. Alsdann erscheint der gelbe Farbstoff und die stets gleichzeitig damit auftretende moosgrüne Fluorescenz. Diese zeigen sich, im Gegensatz zur blauen Fluorescenz, zuerst an der Stelle des Kulturgefässes, an welcher die Gelatineschicht am dünnsten ist, infolge dessen ganz unabhängig von der Breite des Impfstriches, indem an dieser Stelle in der Regel nur ein geringes Wachstum zu beobachten ist. Nach ungefähr 12 Tagen — in dieser Zeit ist der gelbe Farbstoff und die grüne Fluorescenz immer weiter in den Nährboden diffundiert — tritt an der gleichen Stelle, an welcher zuerst der gelbe Farbstoff sichtbar war, die Dunklerfärbung des Substrates ein, indem sich dasselbe mehr orange, später braunrot färbt. Zugleich ist dort keine moosgrüne, sondern eine dunkelgrüne Fluorescenz sichtbar. Nach ungefähr einem Monat ist die ganze Gelatine braunrot gefärbt und fluoresciert dunkelgrün.

Agar alkalisch. Strichkultur: Die blaue Fluorescenz ist vom 2. Tage an undeutlich sichtbar; am 5. Tage beginnen die obersten Schichten des Nährbodens sich moosgrün zu färben. Im weiteren Verlauf des Wachstums schreitet die Fluorescenz ins Innere des Agars vor. Letzteres färbt sich zugleich dunkler.

Bouillonkultur: Die Bouillon trübt sich nach 2 Tagen vollständig. Nach weiteren 2 Tagen beginnen die obersten Schichten der Flüssigkeit gelbgrün zu fluorescieren. Später zeigt das ganze Nährmedium diese gelbgrüne Farbe, die jedoch mit der Zeit in eine braune übergeht. Fluorescenz ist dann nicht mehr sichtbar. Das Auftreten einer Blaufärbung der Bouillon kann wegen ihrer dunkeln Farbe nicht beobachtet werden.

Kartoffelkultur: Hier zeigt sich keine Fluorescenz; der Organismus bildet einen graugelben, später etwas dunkleren Belag.

Gelatine alkalich. Völlig horizontal erstarrt. Impfstrich überall gleich stark. 1) Reagensglaskultur: Nach 1 bis 2 Tagen tritt die blaue Fluorescenz in der ganzen Kultur zu gleicher Zeit auf. Im weiteren Verlauf tritt auch die grüne Fluorescenz auf und zwar nicht wie bei der schräg erstarrten Gelatinekultur nur an einer einzigen Stelle, sondern wie der blaue Farbstoff überall zu gleicher Zeit. Das Auftreten des orangeroten Farbstoffes ist weniger scharf zu beobachten, indem sich die Gelatine

langsam von der Oberfläche her dunkler färbt, bis schliesslich der ganze Nährboden diese Färbung zeigt.

2) Plattenkultur: Am 2. Tage zeigt sich in normaler Weise die blaue Fluorescenz und am Tage darauf unter der ganzen Kolonie die grüne Färbung. Letztere dringt in den nächsten Tagen rasch seitwärts in das Substrat vor.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Es entsteht eine schwache, schmutziggelbe Auflagerung, die sich allmählich aber nur unbedeutend weiter ausbreitet. Nach ungefähr 8 Tagen ist eine leichte Gelbfärbung der Gelatine zu beobachten. Erst nach weiteren 8 Tagen tritt in den obersten Schichten des Substrates die blaue Fluorescenz auf und zwei Tage darauf in normaler Weise die grüne. Diese dringt immer tiefer in den Nährboden vor und verdeckt dadurch die zuerst dort sichtbare blaue. Zugleich färbt sich die Gelatine stärker gelb.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Strichkultur: Längs des Impfstrichs entsteht eine schmutziggelbe Auflagerung, die sich nur sehr schwach über denselben ausdehnt. Die Kultur zeigt grosse Ähnlichkeit mit einer solchen auf Kartoffel, ist jedoch durchaus nicht so kräftig. Nach 14 Tagen zeigt sich die blaue und einige Tage später die grüne Fluorescenz. In durchfallendem Lichte ist schon vorher eine Gelbfärbung der Gelatine zu beobachten.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: In beiden Kulturen ist das Wachstum das gleiche wie auf 2% Traubenzuckergelatine, nur lässt sich noch nach 2½ Monaten keine Spur von fluorescierendem Pigment beobachten. Die Gelatine zeigt jedoch eine leichte Gelbfärbung.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Vom Impfstrich dehnt sich ein breiter, schmutzigweisser, undurchsichtiger Belag aus, dessen Rand unregelmässig gelappt und stellenweise gezähnelt erscheint. Die blaue Fluorescenz ist nach 3 Tagen sichtbar. 2 Tage darauf tritt die grüne Fluorescenz auf und das Substrat wird gelb gefärbt. Nach weiteren 8 Tagen ist dasselbe von tieforangeroter Farbe und fluoresciert nur noch schwach dunkelgrün.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Längs des Impfstrichs breitet sich der Belag rasch über das Substrat aus und zeigt das gleiche, zierliche, farnblattartige Aussehen wie auf reiner Nährgelatine. Bezüglich des Auftretens der Färbungen ist zu bemerken, dass nach 24 Stunden die blaue Fluorescenz sichtbar ist, die jedoch schon am andern Tag durch das Erscheinen des moosgrünen Farbstoffes teilweise ersetzt wird. Nach 4 bis 5 Tagen zeigt die ganze Kultur rein moosgrüne Fluorescenz und citronengelbe

Farbe. Letztere verblasst mit der Zeit. Orangeroter Farbstoff und dunkelgrüne Fluorescenz ist nicht zu beobachten.

Gelatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Vom Impfstrich erfolgt langsam und gleichmässig die Ausbreitung, und es entsteht ein schmutziggelber Belag, dessen Rand fast gerade ist. Später färbt sich die Kolonie braunrot und erreicht eine Breite von 0,5 cm. Bezüglich der auftretenden Färbungen zeigt der Organismus ein merkwürdiges Verhalten. 2 Tage nach der Impfung tritt die blaue Fluorescenz in normaler Weise jedoch nicht mehr stark auf. Die Färbung nimmt in den nächsten Tagen an Stärke zu und zugleich tritt an Stelle des grünfluorescierenden Pigments ein schön braunroter Farbstoff auf. Dieser dringt in den nächsten Tagen immer tiefer in das Substrat vor und lässt im reflektierten Licht deutlich die blaue Fluorescenz erkennen. Erst nach 3 Wochen beginnt die grüne Fluorescenz sichtbar zu werden. Zuletzt zeigt der ganze Nährboden die dunkelrote Farbe und fluoresciert im auffallenden Licht betrachtet schön dunkelgrün.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine 24 Stunden alte Kultur, in der die himmelblaue Fluorescenz allein sichtbar ist, zeigt, in Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt, 3 Wochen lang unverändert diese Färbung. Nach dieser Zeit beginnt dieselbe langsam zu verblassen.

Gelatine sauer. Strichkultur: Die Kolonie zeigt das gleiche Aussehen wie die einer Kartoffelkultur. Es entsteht eine graugelbe, später dunkel sich färbende Auflagerung, die sich etwas über das Substrat erhebt, aber nur unbedeutend vom Strich aus über die Gelatine ausbreitet. In einer 8tägigen Kultur tritt jedoch die blaue Fluorescenz auf, was bei der Kartoffelkultur infolge ihrer Undurchsichtigkeit nicht zu beobachten ist. Später zeigt sich auch die grüne Fluorescenz, nachdem lange vorher schon eine Gelbfärbung des Nährbodens zu erkennen war. Nach einiger Zeit wird die Gelatine getrübt, weshalb die Fluorescenzerscheinungen nur noch undeutlich sichtbar sind.

Gelatine alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der Kultur geschah nach der früher erwähnten Art und Weise. Der Impfstrich von Bacillus fluorescens tenuis war oben am dünnsten, nahm mehr und mehr an Stärke zu, bis er unten ungefähr die doppelte Dicke erreicht hatte. Die beiden Striche des Bacillus acidi lactici, rechts und links davon, waren in ihrem ganzen Verlauf gleich dünn, liefen jedoch nicht so weit hinab wie Bacillus fluorescens tenuis.

Nach 2 Tagen zeigt sich im oberen Teil der Kultur, an welchem die Säurebildung eine viel intensivere wie die Alkalibildung ist, noch keine Spur von Pigment, in der Mitte jedoch, in der sich die beiden Stoffwechselprodukte das Gleichgewicht halten, und unten, wo überhaupt keine Säurebildung stattfindet, tritt die blaue Fluorescenz auf. Im weiteren Verlauf des Wachstums herrscht oben und in der Mitte das gleiche Verhältnis, und infolge dessen ist oben keine, in der Mitte blaue Fluorescenz sichtbar; unten fluoresciert jedoch die Gelatine moosgrün. In der ganzen Kultur sowohl oben wie unten ist der Nährboden gelb gefärbt. Später wird infolge Diffusionserscheinungen der Versuch undeutlich.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: Die Nährlösung trübt sich stark und fluoresciert am 3. Tage in den obersten Flüssigkeitsschichten schön moosgrün. Die Färbung dringt ziemlich rasch nach unten hin vor. In wenigen Tagen ist die ganze Kultur gelb gefärbt und zeigt grüne Fluorescenz.

Mit bernsteinsaurem Ammon: Der Organismus zeigt hier das gleiche Verhalten wie in der vorigen Nährlösung.

Mit Harnstoff und Mannit: Die Entwicklung des Bacillus ist eine langsame. Erst nach 14 Tagen ist die Flüssigkeit stark getrübt, zeigt dann aber auch die gleichstarke Farbstoffbildung wie eine Asparaginlösung.

Mit Harnstoff und Traubenzucker: Noch nach 14 Tagen ist die Trübung der Nährlösung nur unbedeutend. Schliesslich fluoresciert die Flüssigkeit schwach blaugrün.

Mit citronensaurem Ammon: Am 3. Tage ist die Flüssigkeit stark getrübt. Auf dieser hat sich eine starke Decke gebildet. Am 5. Tage färbt sich dort die Lösung leicht gelb und fluoresciert sehr schwach grün. Im weiteren Verlauf klärt sich die Flüssigkeit wieder und zeigt dann eine schmutziggelbe Färbung mit nur geringer Fluorescenz.

Mit weinsaurem Ammon: Die Nährlösung trübt sich schwach, zeigt aber keine Spur von Farbstoffbildung.

Mit buttersaurem Calcium oder mit ameisensaurem Ammon: Es ist weder Wachstum noch Farbstoffproduktion zu beobachten.

Mit bernsteinsaurem Ammon, mit 0,1% Schwefelsäure angesäuert: Die Flüssigkeit zeigt nach 2 Tagen eine starke Trübung. 4 Tage darauf ist in den obersten Flüssigkeitsschichten ein Schimmer

von blauer Fluorescenz zu erkennen, der in den nächsten Tagen ziemlich an Deutlichkeit zunimmt. Nach weiteren 4 Tagen erscheint an derselben Stelle die schön moosgrüne Fluorescenz. Dieser ungefähr 0,5 cm breite Ring hebt sich scharf von der übrigen Flüssigkeit ab, die zwar stark getrübt ist, jedoch keine Spur von Farbstoff zeigt. In den nächsten Tagen dringt diese Färbung immer weiter nach unten hin vor. Schliesslich ist in der ganzen Flüssigkeit die Fluorescenz sichtbar und zwar in solcher Schönheit, wie sie nie in einer alkalischen Nährlösung beobachtet werden kann. Im ganzen Verlauf dieser Kultur ist jede Bewegung der Nährflüssigkeit zu vermeiden, um die Vorgänge in der eben beschriebenen Art und Weise beobachten zu können. Schüttelt man die Flüssigkeit nach dem ersten Erscheinen der grünen Fluorescenz um, so verschwindet dieselbe sofort, um am nächsten Tage an derselben Stelle wieder aufzutreten. Es lässt sich dies so lange fortführen, bis fast auf einmal die ganze Kulturflüssigkeit prachtvoll grün fluoresciert.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Flüssigkeit zeigt dieselbe intensive Trübung und Pigmentbildung wie mit Chlorcalcium.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird nicht so stark und rasch getrübt wie die vorige. Sie besitzt eine mehr blaugrüne Fluorescenz, die jedoch nach 14 Tagen mehr und mehr verschwindet.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Es entsteht nur eine unbedeutende Trübung. Am Boden setzt sich ein geringes, körniges Sediment ab und die Flüssigkeit ist dann wieder klar geworden. Farbstoff wird nicht gebildet.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Flüssigkeit trübt sich ziemlich stark und setzt ein reichliches, flockiges Sediment ab. Die trübe Lösung zeigt keine Spur von Farbstoff.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat:

Mit 0,00125%; 0,0025%; 0,005%; 0,01%.

In diesen 4 Nährlösungen ist langsame Trübung zu beobachten. Am 4. Tage tritt an der Oberfläche die moosgrüne Fluorescenz auf. Nach einigen Tagen ist die ganze Flüssigkeit gelb gefärbt und fluoresciert blaugrün.

Von 0,025% bis 0,2%. Diese Lösungen zeigen das gleiche Verhalten wie die vorigen. Die ganze Flüssigkeit fluoresciert hier jedoch rein moosgrün.

Lösung mit wechselnden Mengen Magnesiumsulfat:
Mit 0,0025%; 0,005%; 0,0075%; 0,01%.

Die beiden ersten Kulturen verhalten sich wie diejenigen Lösungen, welche nur geringe Kaliumphosphatmengen enthalten, die beiden letzten wie die mit mehr Kaliumphosphat.

Bacillus fluorescens putidus.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Nach 24 Stunden zeigt sich im Innern des Substrates die blaue Fluorescenz. Obgleich dieselbe in den nächsten Tagen an Stärke zunimmt, ist sie dennoch nicht so schön himmelblau wie bei Bacillus fluorescens tenuis, sondern erscheint mehr undeutlich verschwommen. Am 8. Tage beginnt die grüne Fluorescenz aufzutreten und die Gelatine färbt sich zugleich gelb. Das Auftreten eines orangeroten Farbstoffes und einer dunkelgrünen Fluorescenz ist nicht zu beobachten. Im Übrigen ist das Auftreten der Färbungen und ihr Vordringen in das Substrat das gleiche wie bei dem vorigen Organismus.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Die Kolonie bildet eine weisse glänzende Auflagerung, die sich gleichmässig über den Strich ausbreitet und nach 3 Wochen eine Breite von ungefähr 1 cm erreicht hat. Der Rand der Kolonie ist stark ausgefressen.

Die blaue Fluorescenz ist hier wie in der Stichkultur am Anfang nur verschwommen sichtbar. Nach 5 Tagen ist diese Färbung viel intensiver geworden. Nach weiteren zwei Tagen zeigt sich die moosgrüne Fluorescenz und zugleich eine Gelbfärbung der Gelatine. Auch in dieser Kultur ist eine spätere Orangefärbung und dunklere Fluorescenz nicht zu beobachten. Das Auftreten der einzelnen Färbungen erfolgt in gleicher Weise wie bei Bacillus fluorescens tenuis.

Agar alkalisch. Strichkultur: Die blaue Fluorescenz zeigt sich nur kurze Zeit und ziemlich undeutlich. Am 3. Tage beginnt die grüne Fluorescenz aufzutreten, die dann ziemlich rasch in's Innere des Substrates vordringt. Nach einiger Zeit ist eine Dunklerfärbung des Nährbodens zu beobachten.

Bouillonkultur: Die Bouillon wird getrübt und zeigt nach einigen Tagen die grüne Fluorescenz. Eine vorausgehende himmelblaue Färbung ist nicht zu beobachten.

Kartoffelkultur: Es entsteht ein grau bis bräunlich gefärbter, dünner, schleimiger Überzug.

Gelatine alkalisch. Völlig gerade erstarrt. Impfstrich überall gleichstark: 1) Reagensglaskultur: Nach 3 bis 4 Tagen

erscheint in der ganzen Kultur zu gleicher Zeit die blaue Fluorescenz und einige Tage später in gleicher Weise die grüne. Zugleich färbt sich dann das Substrat gelb.

2) Plattenkultur: Am 3. Tage lässt sich überall die blaue und den Tag darauf die grüne Fluorescenz erkennen. Diese letztere breitet sich ziemlich rasch seitwärts in das Substrat aus.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Das Wachstum ist nicht sehr bedeutend. Erst nach 3 Wochen tritt die blaue und einige Tage später die grüne Fluorescenz auf. Schon vorher ist eine Gelbfärbung des Substrates zu beobachten.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Strichkultur: Die Kolonie breitet sich nur wenig vom Impfstrich aus. Sie erhebt sich unbedeutend über das Substrat und ist von schmutzig gelber Farbe. Die blaue Fluorescenz erscheint nach ungefähr 3 Wochen und bald darauf auch die Grünfärbung. Schon in einer 10tägigen Kultur lässt sich im Nährboden ein gelber Farbstoff erkennen.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: Die beiden Kulturen zeigen dasselbe Aussehen wie die auf 2% Traubenzuckergelatine. Das Substrat färbt sich gelb, zeigt jedoch noch nach $2^1/_2$ Monaten keine Fluorescenz.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Die Kolonie breitet sich langsam vom Impfstrich über das Substrat aus und zeigt hierbei ungefähr das gleiche Aussehen wie eine Kultur auf Resorcin-freier Gelatine. Am 4. Tage erscheint die blaue Fluorescenz und später die grüne. Der Nährboden ist gelb, nach 3 Wochen orange gefärbt und fluoresciert dann nur noch schwach dunkelgrün

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Der Organismus wächst sehr gut und zeigt die gleiche Auflagerung wie auf reiner Gelatine. Am 2. Tage ist rein blaue Fluorescenz sichtbar, doch tritt schon 24 Stunden später fast vollständig die grüne Färbung an ihre Stelle. Am Tage darauf ist die ganze Gelatine gelb gefärbt und fluoresciert moosgrün.

Gelatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Die Kolonie bleibt fast nur auf den Impfstrich beschränkt und färbt sich später braunrot. Am 3. Tage ist nur kurze Zeit die blaue Fluorescenz sichtbar, da durch Auftreten eines tief braunroten Farbstoffes der Nährboden stetig dunkler wird. Nach einigen Wochen ist in der ganzen Gelatine die dunkle Farbe und im auffallenden Licht eine grüne Fluorescenz zu beobachten.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine rein blau fluorescierende Gelatine in Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt zeigt

diese Färbung 3 Wochen lang unverändert. Nach dieser Zeit beginnt der Farbstoff langsam zu verblassen.

Gelatine sauer. Strichkultur: Es entsteht ein dünner graugelber, später rein gelber Belag, der sich langsam vom Impfstrich entfernt und sich ziemlich stark über das Substrat erhebt. Nach 8 bis 10 Tagen tritt die blaue und einige Tage später die grüne Fluorescenz auf. Später ist infolge eintretender Trübung der Gelatine wenig mehr zu beobachten.

Gelatine alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der Kultur ist wie bei Bacillus fluorescens tenuis. Da oben und in der Mitte der Bacillus acidi lactici viel intensiver wie Bacillus fluorescens putidus gewachsen ist, lässt sich an dieser Stelle keine Spur von blauem Farbstoff beobachten. Im unteren Teile der Kultur tritt jedoch in normaler Weise die blaue und später die grüne Fluorescenz auf. In der ganzen Gelatineschicht ist dann eine leichte Gelbfärbung zu beobachten.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: In der Flüssigkeit treten fein verteilte Flocken auf. Am 3. Tage erscheint in den obersten Schichten die blaue und am nächsten Tage die grüne Fluorescenz, die langsam in's Innere vordringt.

Mit bernsteinsaurem Ammon: Die Färbung ist eine intensivere als die in voriger Nährlösung. Am 3. Tage ist die blaue und nach 6 Stunden die grüne Fluorescenz sichtbar.

Mit Harnstoff und Mannit oder Harnstoff und Traubenzucker: In beiden Kulturflüssigkeiten ist weder Trübung noch Farbstoffbildung zu beobachten.

Mit citronensaurem Ammon: Die Flüssigkeit wird stark getrübt. Am 4. Tage ist nur undeutlich die grüne Fluorescenz zu erkennen. Nach 8 Tagen besitzt die ganze Lösung eine schmutziggelbe Farbe. Die Fluorescenz ist vollständig verschwunden.

Mit weinsaurem Ammon oder buttersaurem Calcium oder ameisensaurem Ammon: Alle Nährlösungen bleiben klar und lassen nicht die geringste Menge Farbstoff erkennen.

Mit bernsteinsaurem Ammon und 0,1% conc. Schwefelsäure: Die Lösung ist nach 2 Tagen stark getrübt. Nach 14 Tagen zeigt sich in den obersten Flüssigkeitsschichten ein Schimmer von blauer Fluorescenz. Sonst zeigt der Organismus in jeder Hinsicht das gleiche Verhalten wie Bacillus fluorescens tenuis. Die grüne

Fluorescenz tritt jedoch erst 8 Tage nach der blauen Fluorescenz in der Kulturflüssigkeit auf.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Trübung der Flüssigkeit und die Pigmentbildung ist die gleiche wie mit Chlorcalcium.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Trübung ist nicht so stark wie in der vorigen Nährlösung. Farbstoff wird nicht gebildet.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Flüssigkeit wird unbedeutend getrübt. Nach einiger Zeit klärt sie sich wieder, nachdem sich ein geringes Sediment abgeschieden hat. Farbstoffbildung ist nicht zu beobachten.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Trübung ist etwas stärker wie in voriger Nährlösung. Es ist weder Gelbfärbung der Lösung noch irgend welche Fluorescenz zu beobachten.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat: Von 0,00125 % bis 0,2 %. Jede Lösung trübt sich stark. Nach 4 Tagen tritt die blaue und nach weiteren 7 Tagen die grüne Fluorescenz in den obersten Flüssigkeitsschichten auf. Letztere Färbung nimmt langsam an Stärke zu.

Lösung mit wechselnden Mengen Magnesiumsulfat: Von 10,0025 % bis 0,01 %. Sämtliche Nährlösungen zeigen eine starke Trübung. Eine Farbstoffbildung findet nicht statt.

Bacillus fluorescens albus.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Am 2. Tage tritt die schön himmelblaue Fluorescenz auf und bleibt 8 Tage allein und sehr deutlich sichtbar. Nach dieser Zeit zeigt sich die moosgrüne Fluorescenz und die Gelbfärbung der Gelatine. Nach weiteren 5 Tagen fluoresciert nur noch die unterste Schicht blau. Oben zeigt sich zugleich eine Orangefärbung und eine dunkelgrüne Fluorescenz. Das Auftreten und Vordringen der einzelnen Färbungen in den Nährboden ist wie bei Bacillus fluorescens tenuis.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Die blaue Fluorescenz erscheint an derselben Stelle und mit der gleichen Intensität wie bei Bacillus fluorescens tenuis. Am 4. Tage tritt an der dünnsten Gelatineschicht die moosgrüne Fluorescenz auf und das Substrat färbt sich gleichzeitig deutlich gelb. Am 8. Tage fluoresciert der ganze

Nährboden grün. Nach 24 Stunden beginnt in normaler Weise der Orangefarbstoff und die dunkelgrüne Fluorescenz aufzutreten.

Agar alkalisch. Strichkultur: Nur kurze Zeit ist die himmelblaue Färbung sichtbar. Schon am 3. Tage erscheint die grüne Fluorescenz, die dann rasch in den Nährboden vordringt. Zugleich färbt sich dieser dunkler.

Bouillonkultur: Nach 2 Tagen ist die Bouillon vollständig getrübt. Später zeigt die Flüssigkeit von oben nach unten hin fortschreitende grüne Fluorescenz. Letztere ist oben stets am intensivsten.

Kartoffelkultur: Es entsteht ein verhältnismässig dünner, grauer bis gelblichgrauer, später bräunlicher, feuchtglänzender Belag. Fluorescenz wird nicht beobachtet.

Gelatine alkalisch. Völlig gerade erstarrt. Impfstrich überall gleichstark. 1) Reagensglaskultur: Nach 48 Stunden fluoresciert die ganze unter der Kolonie gelegene Gelatineschicht intensiv himmelblau. Diese Färbung dringt gleichmässig in das Substrat vor. Nach 4 Tagen tritt in gleicher Weise die grüne Fluorescenz und die Gelbfärbung des Nährbodens auf. Später wird die Färbung dunkler und das Substrat fluoresciert mehr dunkelgrün.

2) Plattenkultur: Die blaue Fluorescenz erscheint nach 2 Tagen in ganz normaler Weise. Am Tage darauf zeigt sich die grüne Färbung, die seitwärts weit in das Substrat vordringt.

Gelatine mit 2 % Traubenzucker. Stichkultur: Das Wachstum ist das gleiche wie auf der reinen Nährgelatine. Am 5. Tage tritt die blaue Fluorescenz auf und nimmt in den nächsten Tagen an Stärke zu. Später fluorescieren die obersten Gelatineschichten grün und zeigen im durchfallenden Licht den gelben Farbstoff. Zuletzt ist die Orangefärbung sichtbar.

Gelatine mit 2 % Traubenzucker. Strichkultur: Die Kolonie breitet sich sehr rasch vom Impfstrich über das Substrat aus. Am 2. Tage ist an der Stelle des grössten Wachstums die blaue Fluorescenz sichtbar. Diese verschwindet dann in den nächsten Tagen, um am 5. Tage wieder zu erscheinen. Später ist grüne Fluorescenz und Gelb-Orangefärbung des Nährbodens zu beobachten.

Gelatine mit 4 % Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: Das Wachstum ist in beiden Kulturen dasselbe wie auf Gelatine mit nur 2 % Traubenzucker. Erst nach 14 Tagen erscheint jedoch die blaue und einige Tage später die grüne Fluorescenz. Die Gelatine ist zuerst gelb, später orange gefärbt.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Die Kolonie stellt einen durchsichtigen, dünnen Belag mit feingezähneltem Rande dar. Der Impfstrich erreicht eine Breite bis zu 1 cm. Das Auftreten

der Färbungen erfolgt in derselben Zeit wie in Resorcin-freier Nährgelatine, nur ist in einer älteren Kultur die dunkelgrüne Fluorescenz wenig sichtbar.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Das ameisensaure Natrium beeinträchtigt das Wachstum in keiner Weise. Am 2. Tage erscheint die blaue Fluorescenz und schon am Tage darauf beginnt die grüne aufzutreten. In kurzer Zeit ist der ganze Nährboden gelb gefärbt und fluoresciert rein moosgrün.

Gelatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Der Belag dehnt sich ziemlich weit vom Impfstrich aus und hat ungefähr nach 14 Tagen eine Breite von 0,5 cm erreicht. Die Kolonie zeigt eine braunrote Farbe. Das Auftreten der einzelnen Färbungen erfolgt in gleicher Weise wie bei Bacillus fluorescens tenuis.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine schön blau fluorescierende Kultur des Organismus in Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt zeigt noch nach 3 Wochen unverändert die Fluorescenz. Nach dieser Zeit beginnt die Farbe langsam zu verblassen.

Gelatine sauer. Strichkultur: Es entsteht ein grauer bis gelblichgrauer, später hellbrauner Belag, der eine ziemliche Dicke erreicht und sich nur langsam über den Impfstrich hinaus ausdehnt. Die blaue Fluorescenz beginnt am 5. Tage, die grüne einige Tage später aufzutreten. Die Gelatine nimmt eine gelbe Färbung an, die jedoch durch auftretende Trübungen undeutlich wird.

Gelatine alkalisch. Stichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der Kultur erfolgte nach der bei Bacillus fluorescens tenuis angegebenen Methode. Das Aufteten der einzelnen Färbungen geht ebenfalls wie dort beschrieben von statten.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin oder bernsteinsaurem Ammonium: Die Flüssigkeit trübt sich rasch. Am 2. Tage befindet sich an der Oberfläche eine zusammenhängende Bakterienschicht. Am nächsten Tage ist dort die blaue und 6 Stunden später die moosgrüne Fluorescenz deutlich sichtbar. Der Farbstoff dringt rasch nach unten hin vor, und die Flüssigkeit färbt sich gelb.

Mit Harnstoff und Mannit oder Harnstoff und Traubenzucker: In beiden Nährlösungen ist nur eine leichte Trübung, jedoch keine Farbstoffbildung zu beobachten.

Mit citronensaurem Ammon oder weinsaurem Ammo-

nium: Das Wachstum und die Pigmentbildung erfolgt hier mit der gleichen Intensität wie in Asparaginlösung.

Mit buttersaurem Calcium oder ameisensaurem Ammon: Die Flüssigkeit wird nicht getrübt. Farbstoff kann nicht beobachtet werden.

Mit bernsteinsaurem Ammon und 0,1 % conc. Schwefelsäure: Die Nährlösung wird sehr rasch und stark getrübt. Am 3. Tage fluoresciert die oberste Flüssigkeitsschicht schön moosgrün und nach weiteren 2 Tagen die ganze Nährlösung.

Da hier die Neutralisation der freien Säure in ungemein rascher Weise erfolgte, wurde noch ein Versuch mit einer grösseren Menge Nährsalzlösung ausgeführt. In einem Literkolben wurden 250 ccm Nährlösung gegeben, dieselbe sterilisiert, dann geimpft. Schon am 2. Tage ist die Flüssigkeit stark getrübt und zeigt nach weiteren 12 Stunden oben eine ungefähr 1 cm breite Schicht, in der die moosgrüne Fluorescenz mit leuchtender Farbe sichtbar ist. Beim Umschütteln verschwindet jede Spur von Farbstoff, um bei ruhigem Stehen am nächsten Tage in gleicher Stärke wieder aufzutreten. Schüttelt man jetzt um, so zeigt die ganze Flüssigkeit eine blaugrüne Fluorescenz und eine neutrale Reaktion. Setzt man nun weitere 3 Tropfen conc. Schwefelsäure zu, so verschwindet die Fluorescenz, um jedoch am nächsten Tage an der Oberfläche wieder aufzutreten. Nach weiteren 12 Stunden ist der Farbstoff in der ganzen Lösung sichtbar.

Auf diese Weise kann man wiederholt von 3 zu 3 Tagen je 3 Tropfen Schwefelsäure zufügen, um stets ein augenblickliches Verschwinden der inzwischen wieder sichtbaren Fluorescenz zu bewirken. [1]

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Das Fehlen dieses Nährsalzes bewirkt weder eine Änderung in der Trübung der Flüssigkeit noch in der Farbstoffproduktion.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Trübung der Nährlösung ist hier nicht so stark wie in der vorigen. Am 4. Tage ist an der Oberfläche die grüne Fluorescenz nur schwach sichtbar. Später besitzt die ganze Kulturflüssigkeit eine mehr blaugrüne Farbe.

---

[1] Diesen Versuch habe ich deswegen ausgeführt, um zu beweisen, dass die bei der Zersetzung stickstoffhaltiger Substanzen freiwerdende Ammoniakmenge durchaus keine so geringe ist, wie man gewöhnlich anzunehmen pflegt.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Das Wachstum ist ganz unbedeutend. Farbstoff wird nicht gebildet.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird getrübt, doch ist weder eine Gelbfärbung der Flüssigkeit noch eine Fluorescenz zu bemerken.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat: Von 0,00125% bis 0,2%. In sämtlichen Nährlösungen ist nach einigen Tagen an der Oberfläche eine blaue, am Tage darauf eine grüne Fluorescenz zu beobachten, die langsam in die tieferen Schichten vordringt und zuletzt in der ganzen Flüssigkeit sichtbar ist. Der Farbstoff erscheint in den einzelnen Lösungen in der ersten Zeit um so intensiver, je mehr Phosphat dieselben enthalten. Nach 5 Tagen ist jedoch in allen Kulturkölbchen die grüne Fluorescenz in gleicher Stärke sichtbar.

Lösung mit wechselnden Mengen Magnesiumsulfat: Von 0,0025% bis 0,01%. Die Trübung ist überall eine gleichstarke. Am 3. Tage beginnt die Fluorescenz aufzutreten. Dieselbe ist bei 0,0025% Magnesiumsulfat eine blaue, bei einem grösseren Gehalt eine blaugrüne und bei 0,01% eine fast rein grüne. Nach kurzer Zeit verschwinden diese Unterschiede und sämtliche Lösungen zeigen dann die grüne Fluorescenz.

Bacillus erythrosporus.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Nach 24 bis 48 Stunden ist die himmelblaue Fluorescenz sehr deutlich sichtbar. Am 5. Tage lässt sich an der Oberfläche des Substrates der Übergang der blauen Färbung in die grüne beobachten. Zu gleicher Zeit färbt sich das Substrat gelb. Nach 3 Wochen ist die blaue Farbe verschwunden; oben ist der Nährboden tief orange, sonst überall gelb gefärbt. Die Fluorescenz ist oben dunkel- unten mehr moosgrün.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Das Auftreten der blauen und grünen Fluorescenz, der Gelb- und später Orange-Färbung der Gelatine erfolgt in gleicher Weise und ungefähr um dieselbe Zeit wie bei Bacillus fluorescens albus.

Agar alkalisch. Strichkultur: Die blaue Fluorescenz ist nur sehr undeutlich sichtbar. Schon am 3. Tage fluoresciert die oberste Schicht des Nährbodens grün. Diese Färbung dringt weiter ins Innere des gleichzeitig dunkler werdenden Substrates vor.

Bouillonkultur: Die Nährflüssigkeit trübt sich rasch und zeigt nach einigen Tagen in den obersten Flüssigkeitsschichten gelbgrüne Fluorescenz. Diese dringt mit der Zeit weiter nach unten vor.

Kartoffelkultur: Es entsteht eine vom Impfstrich sich nur wenig ausbreitende, anfänglich rötliche, später nussfarbene Auflagerung.

Gelatine alkalisch. Völlig gerade erstarrt. Impfstrich überall gleichstark:

1. Reagensglaskultur.
2. Plattenkultur.

Beide Kulturen zeigen bezüglich der Art und Zeit des Auftretens der Färbungen das gleiche Verhalten wie die von Bacillus fluorescens tenuis.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Das Wachstum ist nur kümmerlich. Nach 3 Wochen tritt die blaue, etwas später die grüne Fluorescenz auf. Das Substrat ist zuerst gelb, später orange gefärbt.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Strichkultur: Die Kolonie dehnt sich nur sehr schwach über den Impfstrich hinaus aus und zeigt eine hellgelbe, später mehr braune Farbe. Nach 14 Tagen tritt die blaue und später die grüne Fluorescenz auf. In einer 10 Tage alten Kultur ist das Substrat gelb, dann orange gefärbt.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: Das Wachstum ist dasselbe wie auf einer nur 2% Traubenzuckergelatine, doch ist nach 2 Monaten zwar Orangefärbung der Gelatine, jedoch noch keine Fluorescenz zu beobachten.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Der Strich breitet sich bis zu 0,5 cm aus und zeigt einen ausgefranzten, stellenweise feingezähnelten Rand. Am 4. Tage zeigt sich die blaue, 2 Tage darauf die grüne Fluorescenz. Nach 3 Wochen ist der Nährboden tief orange gefärbt und fluoresciert dunkelgrün.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Die Kolonie zeigt eine rasche Ausbreitung. Am 2. Tage ist die blaue, ein Tag nachher die grüne Fluorescenz zu beobachten. Zugleich ist der gelbe Farbstoff sichtbar.

Gelatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Das Aussehen der Kolonie und das Auftreten der Färbungen ist wie bei Bacillus fluorescens tenuis.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine Kultur, in der nur die blaue Fluorescenz sichtbar ist, zeigt unter Wasserstoff aufbewahrt noch nach 3 Wochen keine Veränderung der Farbe. Erst nach dieser Zeit beginnt dieselbe nach und nach zu verblassen.

Gelatine sauer. Strichkultur: Das Wachstum ist hier dasselbe wie auf Kartoffel. Am 5. Tage ist die blaue Fluorescenz sichtbar und nimmt am nächsten Tage an Stärke zu. Etwas später

tritt an deren Stelle die grüne Färbung. Zuletzt wird die Gelatine getrübt.

Gelatine alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der Impfstriche geschah nach der bei Bacillus fluorescens tenuis beschriebenen Methode. Der weitere Verlauf des Versuches ist der nämliche wie dort.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin oder bernsteinsaurem Ammonium Die Flüssigkeit wird stark getrübt. Am 3. Tage ist die blaue, in den nächsten Tagen die grüne Fluorescenz sichtbar. Diese dringt langsam nach unten, so dass zuletzt die ganze Kultur gelbgrün fluoresciert.

Mit Harnstoff und Mannit oder Harnstoff und Traubenzucker: Hier ist nur kümmerliches Wachstum und keine Pigmentbildung zu beobachten.

Mit citronensaurem Ammon: Die Trübung und die Pigmentbildung tritt hier mit derselben Stärke wie in der Asparaginlösung auf.

Mit weinsaurem Ammon oder buttersaurem Calcium oder ameisensaurem Ammon: In diesen Nährflüssigkeiten erfolgt weder Trübung noch Farbstoffbildung.

Mit bernsteinsaurem Ammon und 0,1% conc. Schwefelsäure: Das Auftreten der Färbungen erfolgt zu derselben Zeit und in derselben Art und Weise wie bei Bacillus fluorescens albus.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Lösung zeigt in jeder Hinsicht das gleiche Verhalten wie mit Chlorcalcium.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Trübung der Nährlösung ist nicht ganz so stark wie in der vorigen Kulturflüssigkeit. Am 4. Tage ist in der obersten Flüssigkeitsschicht die grüne Fluorescenz schwach sichtbar. Später nimmt die ganze Kultur eine mehr blaugrüne Färbung an.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Flüssigkeit wird unbedeutend getrübt. Farbstoffbildung findet nicht statt.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird getrübt, doch ist weder eine Gelbfärbung der Flüssigkeit noch irgend eine Fluorescenz zu bemerken.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat: Von 0,00125% bis 0,2%. Die Trübung erfolgt in allen Nährlösungen zu gleicher Zeit. Nach 2 bis 3 Tagen ist in sämtlichen Flüssigkeiten eine blaue Färbung zu beobachten. In den vier ersten Versuchen, die 0,00125% bis 0,01% Kaliumphosphat enthalten, bleibt noch 2 Tage diese Fluorescenz bestehen. Nach dieser Zeit jedoch zeigen sie, wie die mit grösserem Phosphatgehalt gleich, moosgrüne Fluorescenz, die in wenigen Tagen in der ganzen Kulturflüssigkeit sichtbar ist.

Lösung von wechselnden Mengen Magnesiumsulfat: Von 0,0025% bis 0,01%. Am 3. Tage ist in sämtlichen Nährlösungen die blaue Fluorescenz zu erkennen. Diese geht um so später in die grüne Fluorescenz über, je niedriger der Magnesiumgehalt ist. Nach einigen Tagen ist jedoch in allen Kulturen die gelbgrüne Färbung zu beobachten.

Bacillus viridans.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Nach 24 Stunden tritt im Innern des Nährbodens etwas unterhalb der Kolonie die blaue Fluorescenz auf. In den nächsten Tagen nimmt die Färbung an Stärke zu und die Kolonie beginnt infolge Verflüssigung der Gelatine langsam einzusinken. Nach ungefähr 2 Wochen ist die verflüssigte Schicht ungefähr 0,5 cm breit, besitzt eine gelbe Farbe und zeigt grüne Fluorescenz. Die nicht verflüssigte Gelatine fluoresciert blau, später jedoch grün und ist dann gleichfalls gelb gefärbt.

Agar alkalisch. Strichkultur: Unter der breitesten Stelle der Strichkultur ist am 2. Tage die blaue Fluorescenz deutlich zu erkennen. Am Tage darauf beginnt an der dünnsten Schicht des Nährbodens die grüne Fluorescenz aufzutreten. Dieselbe ist dann längs der ganzen Strichkultur an der Oberfläche des Substrates sichtbar und dringt jetzt erst nach unten hin vor. Später nimmt das Agar eine Orangefärbung an. Diese Färbung ist zuerst an der dünnsten Stelle der Kultur zu beobachten.

Bouillonkultur: Die Bouillon trübt sich in kurzer Zeit und zeigt nach einigen Tagen in der obersten Flüssigkeitsschicht gelbgrüne Fluorescenz. Diese Färbung dringt rasch nach unten hin vor und ist in der ganzen Kultur sichtbar.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Das Wachstum des Organismus ist ein sehr gutes. Die Gelatine wird langsam verflüssigt. Nach 14 Tagen tritt die blaue Fluorescenz auf.

Nach weiteren 2 Tagen zeigt sich die moosgrüne Fluorescenz, zuerst zwar nur in dem verflüssigten Teile der Kultur, später jedoch auch in der nicht verflüssigten Gelatineschicht. Diese ist zugleich gelb gefärbt.

Gelatine mit 4 % Traubenzucker. Stichkultur: Die Entwicklung des Organismus erfogt in gleicher Weise wie in einer Gelatine mit nur 2 % Traubenzucker. Mit der Zeit färbt sich die Kultur dunkler. Fluorescenz tritt nicht auf.

Gelatine mit Resorcin. Stichkultur: Am 4. Tage tritt die blaue Fluorescenz auf. Zwei Tage darauf geht dieselbe in grün über. Zugleich erfolgt langsame Verflüssigung des Nährbodens.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Stichkultur: Nach 48 Stunden erscheint die blaue Fluorescenz und nach weiteren 12 Stunden die grüne. Die Gelatine wird langsam verflüssigt.

Gelatine mit Hydrochinon. Stichkultur: Der Organismus lässt nur sehr schwaches Wachstum erkennen. Die Verflüssigung der Gelatine erfolgt nur langsam. Die verflüssigte Schicht ist bräunlich gefärbt. Fluorescenz kann nicht beobachtet werden.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine schön himmelblau fluorescierende Kultur wurde in Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt. Die Färbung blieb hierbei 3 Wochen lang deutlich sichtbar. Nach dieser Zeit verblasste sie langsam.

Agar sauer. Stichkultur. Von der Einstichstelle dehnt sich eine bräunlichgelbe, wie siebartig durchlöcherte, Auflagerung ziemlich rasch über die ganze Oberfläche aus. Am 4. Tage ist die blaue, einige Tage später die grüne Fluorescenz zu beobachten. Der Nährboden zeigt in älteren Kulturen eine dunkelorange Färbung.

Agar sauer. Strichkultur: Es entsteht ein bräunlichweisser Belag, der sich langsam über den Impfstrich ausbreitet. Am 3. Tage zeigt sich die blaue und den Tag darauf die grüne Fluorescenz.

Agar alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der drei Impfstriche erfolgt in der bei Bacillus fluorescens tenuis angegebenen Weise. Das Erscheinen der einzelnen Färbungen tritt wie dort beschrieben ein, jedoch infolge der veränderten Zusammensetzung des Nährbodens mit geringerer Deutlichkeit.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen Nährstoffen.

Mit Aspargin: Die Flüssigkeit wird am 3. Tage stark getrübt. Am nächsten Tage erscheint in der obersten Flüssigkeits-

schicht undeutlich die blaue Fluorescenz. Nach 48 Stunden fluoresciert diese Schicht moosgrün, die Färbung dringt langsam nach unten hin vor und die ganze Nährlösung zeigt zuletzt eine gelbgrüne Färbung.

Mit bernsteinsaurem Ammonium: Die Trübung der Nährflüssigkeit erfolgt am 2. Tage. Nach weiteren 2 Tagen erscheint in normaler Weise die grüne Fluorescenz, die rasch in die Tiefe vordringt und bald in der ganzen Kultur sichtbar ist.

Mit Harnstoff und Mannit oder Harnstoff und Traubenzucker: Beide Kulturen zeigen das gleiche Verhalten wie die Asparaginlösung.

Mit citronensaurem Ammonium: Die Flüssigkeit trübt sich ziemlich rasch, lässt jedoch keine Spur von Fluorescenz erkennen.

Mit buttersaurem Calcium oder weinsaurem Ammon oder ameisensaurem Ammon: Die Kulturen bleiben klar und zeigen keine Farbstoffbildung.

Mit bernsteinsaurem Ammon und 0,1 % conc. Schwefelsäure: Nach 48 Stunden ist die Nährlösung stark getrübt. Am Tage befindet sich an der Oberfläche eine zusammenhängende Bakterienhaut und zugleich prächtig moosgrüne Fluorescenz. Die Kultur zeigt weiter das bei Bacillus fluorescens tenuis beschriebene Verhalten.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Entwicklung des Organismus ist die gleiche wie mit Chlorcalcium.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird rasch getrübt, doch ist nicht die geringste Farbstoffbildung zu beobachten.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Flüssigkeit bleibt klar und vollständig ungefärbt.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Trübung ist nur unbedeutend. Gelbfärbung oder Fluorescenz ist nicht zu erkennen.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat: Von 0,00125 % bis 0,05 %. In den einzelnen Nährflüssigkeiten erfolgt die Trübung ungefähr um dieselbe Zeit und ziemlich rasch, doch erscheint erst nach 5 Tagen die grüne Fluorescenz. Dieselbe ist um so stärker, je mehr Phosphat dieselbe enthält. Bevor die

grüne Fluorescenz auftritt, scheint in der obersten Flüssigkeitsschicht ein schwach-blauer Schimmer vorhanden zu sein.

Von 0,1 % bis 0,2 %. Die Trübung ist in beiden Kulturkölbchen eine sehr starke. Bei 0,1 % Phosphat erscheint die grüne Fluorescenz am 4. Tage, bei 0,2 % schon am 3. Tage. Während im ersten Kölbchen diese Färbung nur langsam an Stärke zunimmt, zeigt die zweite Kulturflüssigkeit eine prächtig grüne Farbe.

Lösung mit wechselnden Mengen Magnesiumsulfat: Von 0,0025 % bis 0,01 %. Sämtliche Kulturflüssigkeiten werden ziemlich rasch getrübt. Direkt an der Oberfläche ist die blaue Fluorescenz nur undeutlich sichtbar. Am 4. Tage tritt die grüne Fluorescenz auf, die, langsam an Stärke zunehmend, zugleich nach unten hin vordringt.

Bacillus pyocyaneus Ernst. Blauer Eiter Körber. Bacillus pyocyaneus Gessard [1]. Bacillus pyocyaneus Gessard [2].

Diese vier verschiedenen Formen des Bacillus pyocyaneus verhalten sich bezüglich ihrer Entwicklung und ihrer Farbstoffproduktion im Allgemeinen vollkommen gleich. Um Wiederholungen zu vermeiden, führe ich infolge dessen die mit jedem einzelnen angestellten Versuche nachstehend im Zusammenhange an, indem ich auf kleine Unterschiede im einzelnen Fall jeweils besonders hinweise.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Nach 24 Stunden ist die Gelatine oberflächlich verflüssigt. Im auffallenden Lichte betrachtet zeigt sich die blaue Fluorescenz. Bei fortschreitender Verflüssigung erfolgt horizontale Abgrenzung von der festen Gelatine. Letztere fluoresciert schön himmelblau, die verflüssigte Schicht prachtvoll moosgrün, bei Bacillus pyocyaneus Ernst hingegen blaugrün. Später ist auch in der festen Gelatine die Fluorescenz und eine Gelbfärbung des Substrates zu beobachten. Bei Bacillus pyocyaneus Ernst ist in gleicher Zeit die ganze Kultur verflüssigt, die Färbung stets noch eine blaugrüne, nimmt jedoch nach unten hin an Stärke ab.

Agar alkalisch. Strichkultur: Es entsteht ein trockener grünlich weisser Belag. Am 2. Tage ist unterhalb der Kolonie deutlich die blaue Fluorescenz zu beobachten. Am nächsten Tage zeigt sich an der dünnsten Stelle des Nährbodens die grüne Fluorescenz. Diese ist zunächst in den obersten Schichten, später in der ganzen, Kultur sichtbar. Das Substrat zeigt dann eine Orangefärbung.

Bouillonkultur: Am 3. bis 4. Tage beginnt an der Ober-

fläche der Bouillon die grüne Fluorescenz aufzutreten. Diese Färbung ist nach kurzer Zeit in der ganzen Nährflüssigkeit sichtbar.

Kartoffelkultur: Bacillus pyocyaneus Ernst zeigt das für ihn charakteristische Wachstum, wie es eingehend in der Einleitung beschrieben ist. Die 3 anderen Arten verhalten sich wie Bacillus pyocyaneus d.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Die Gelatine wird langsam verflüssigt. Am 6. Tage ist die blaue und einige Tage später die grüne Fluorescenz in der Kultur zu erkennen.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stichkultur: Die Kultur zeigt das gleiche Verhalten wie eine solche die nur 2% Traubenzucker enthält. Die blaue Färbung erscheint jedoch erst am 10. Tage. 2 Tage nachher ist die grüne Fluorescenz zu beobachten

Gelatine mit Resorcin. Stichkultur: Die Verflüssigung des Nährbodens erfolgt nur langsam. Nach einiger Zeit tritt die blaue und etwas später die grüne Fluorescenz auf. In einer 14 Tage alten Kultur besitzt die verflüssigte Schicht eine Orangefärbung und dunkelgrüne, bei Bacillus pyocyaneus Ernst mehr hellgrüne Fluorescenz. Die feste Gelatine ist gelb gefärbt und fluoresciert moosgrün.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Stichkultur: Die Gelatine wird in normaler Weise verflüssigt. Am 2. oder 3. Tage ist die blaue Fluorescenz zu beobachten, die jeweils am darauffolgenden Tage in die grüne übergeht.

Gelatine mit Hydrochinon. Stichkultur: Der Nährboden wird langsam verflüssigt. In den ersten Tagen ist dann die blaue Fluorescenz sehr gut zu beobachten. Später verschwindet dieselbe mehr und mehr, indem sich die verflüssigte Schicht braunrot färbt und nach 14 Tagen grün fluoresciert.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Eine Kultur, welche die blaue Fluorescenz sehr schön zeigt, wird in einer Wasserstoffatmosphäre aufbewahrt. Die Färbung bleibt hier ungefähr 3 Wochen unverändert, dann tritt jedoch langsames Erblassen ein.

Agar sauer. Strichkultur: Es entsteht eine trockene rehfarbige Auflagerung, die sich langsam über den Impfstrich ausdehnt. Nach 4 bis 6 Tagen beginnen die obersten Schichten des Nährsubstrates grün zu fluorescieren und das Substrat wird dunkel gefärbt. Bei Bacillus pyocyaneus β ist ein Chamäleonphenomen, wie Ernst es beschreibt, nicht zu beobachten.

Agar alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der Kultur und der Verlauf des Versuches sind die gleichen wie bei Bacillus viridans.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: Die Nährlösung ist am 2. Tage stark getrübt. Am 5. Tage erscheint in den obersten Flüssigkeitsschichten die blaue Fluorescenz. In den nächsten Tagen nimmt die ganze Kulturflüssigkeit eine blaugrüne Färbung an. Erst am 10. Tage beginnt direkt an der Oberfläche die moosgrüne Fluorescenz aufzutreten, die dann jedoch sehr rasch nach unten vordringt.

Mit bernsteinsaurem Ammonium: Mit Ausnahme von Bacillus pyocyaneus Ernst ist hier die Trübung und Farbstoffproduktion die gleiche wie in Asparaginlösung. Diese Varietät zeigt schon am 5. Tage in der obersten Flüssigkeitsschicht und den Tag darauf in der ganzen Nährlösung die moosgrüne Fluorescenz.

Mit Harnstoff und Mannit: Bacillus pyocyaneus Ernst und Körber zeigen das gleiche Verhalten wie in Asparaginlösung. Bei den beiden anderen Varietäten ist die grüne Fluorescenz schon 4 Tage früher deutlich sichtbar.

Mit Harnstoff und Traubenzucker: Die einzelnen Formen des Bacillus pyocyaneus zeigen in dieser Nährlösung dasselbe Verhalten wie in Asparaginlösung, ausgenommen Bacillus pyocyaneus Ernst, der sich hier wie in bernsteinsaurem Ammon verhält.

Mit citronensaurem Ammonium: Die Flüssigkeit wird sehr bald getrübt. Später scheidet sich ein schleimiges Sediment ab. Nach 7 Tagen ist die blaugrüne und einige Tage darauf die moosgrüne Fluorescenz, jedoch nicht sehr schön sichtbar. Eine Ausnahme hierbei bildet Bacillus pyocyaneus Gessard[2], der am 6. Tage prächtig moosgrüne Fluorescenz erkennen lässt.

Mit weinsaurem Ammonium: Die Nährlösung wird mässig getrübt und lässt keine Farbstoffbildung erkennen.

Mit buttersaurem Calcium: Ausgenommen von Bacillus pyocyaneus Ernst ist weder eine Trübung der Kulturflüssigkeit noch Pigmentbildung zu beobachten. Dieser zeigt nach 7 Tagen in der fast klaren Flüssigkeit deutlich blaue Fluorescenz, die nach einigen Tagen in eine mehr blaugrüne übergeht.

Mit milchsaurem Ammonium: Die verschiedenen Raçen verhalten sich hier vollkommen gleich. Am 8. Tage ist die blaugrüne und 3 Tage später die moosgrüne Fluorescenz sichtbar.

Mit ameisensaurem Ammonium: Die Trübung der Lösung ist unbedeutend. Farbstoff wird nicht gebildet.

Mit bernsteinsaurem Ammonium und 0,1% conc. Schwefelsäure: Sämtliche 4 Varietäten zeigen dasselbe Verhalten

wie Bacillus fluorescens albus, nur tritt bei Bacillus pyocyaneus Ernst die grüne Fluorescenz früher ein wie bei den 3 anderen Formen.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Am 5. Tage ist in der obersten Schicht der Flüssigkeit die blaue Fluorescenz sichtbar. Diese geht bei Bacillus pyocyaneus Ernst nach 2 Tagen, bei den übrigen Arten erst nach 4 Tagen in die prächtig moosgrüne Färbung über.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Flüssigkeit wird langsam getrübt und zeigt dann einen bläulichen Schimmer. Nach 14 Tagen hat sich nur ein geringes Sediment abgeschieden. Die darüber stehende Schicht ist farblos.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Flüssigkeit wird schwächer getrübt, wie die vorige, zeigt sonst jedoch das gleiche Verhalten.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die 4 verschiedenen Formen des Bacillus pyocyaneus zeigen hier dasselbe Verhalten wie in einer Nährlösung ohne Magnesiumsulfat allein.

Lösung mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat: Von 0,00125% bis 0,01%. Am 5. Tage zeigt sich in den obersten Flüssigkeitsschichten sämtlicher Nährlösungen die blaue Fluorescenz und einige Tage später, wenn auch nicht sehr stark, die grüne Fluorescenz. Nach 3 Wochen besitzen die Kulturen eine blaugrüne Farbe.

Von 0,02% bis 0,2%. Die blaue Fluorescenz ist hier deutlich erkennbar. Bei Bacillus pyocyaneus Ernst erscheint die moosgrüne Fluorescenz am 5. oder 6., bei den übrigen Formen erst am 10. Tage.

Lösung mit wechselnden Mengen Magnesiumsulfat: Mit 0,0025%; 0,005%; 0,0075; 0,01%.

In sämtlichen Nährlösungen ist zuerst die blaue, später die grüne Fluorescenz zu beobachten. Bei den 2 ersten Versuchen tritt die grüne Färbung zwar schwach doch deutlich auf. Die Färbung älterer Kulturen ist blaugrün. Bei den 2 letzteren Versuchen erscheint die grüne Fluorescenz um so intensiver, je mehr Magnesiumsulfat derselbe enthält.

Bacillus pyocyaneus Gessard 3 [1].

Auf sämtlichen festen Nährböden, die bei den anderen Varietäten zur Verwendung kamen, zeigt der Organismus ein sehr gutes Wachstum, bildet jedoch in keinem einzigen auch nur die geringste Spur von Farbstoff. Sämtliche Nährböden, die Gelatine enthalten, werden energisch verflüssigt, gleichviel ob dieselben eine alkalische oder saure Reaktion zeigen. In einer Hydrochinongelatine ist die verflüssigte Schicht dunkel gefärbt.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: Die Flüssigkeit wird stark getrübt. Später klärt sich die Lösung auf, indem sich ein schmutzigweisses Sediment abscheidet. Farbstoffbildung findet nicht statt.

Mit bernsteinsaurem Ammon: Die Nährlösung zeigt das gleiche Verhalten wie die Asparaginlösung. Die Flüssigkeit und das abgeschiedene Sediment sind etwas gelb gefärbt.

Mit Harnstoff und Mannit oder Harnstoff und Traubenzucker: Die Trübung der Flüssigkeiten ist die gleiche wie in Asparaginlösung. Die Farbe der einzelnen Lösungen ist gelbgrün, jedoch ohne Fluorescenz.

Mit citronensaurem Ammonium: Die Entwicklung des Organismus ist eine gute. Farbstoff wird nicht gebildet.

Mit weinsaurem Ammonium: Die Flüssigkeit wird nur unbedeutend getrübt. Farbstoffbildung ist nicht zu beobachten.

Mit buttersaurem Calcium[2]: Die Nährlösung bleibt unverändert.

Mit bernsteinsaurem Ammon und 0,1% Schwefelsäure:

1) ohne Zusatz von fluorescierendem Pigment: Die Kultur verhält sich wie die alkalische Nährlösung.

2) mit fluorescierendem Pigment[3]. Der alkalischen Nährlösung wird so lange fluorescierender Farbstoff zugesetzt, bis

[1] Die Kultur, welche mir zur Verfügung stand, hatte im Laufe der Jahre durch fortgesetztes Umimpfen auf Agar die Fähigkeit, das fluorescierende Pigment zu bilden, verloren. Infolge dessen konnte der Organismus nicht zusammen mit den anderen Varietäten beschrieben werden.

[2] Die Kulturen mit milchsaurem und ameisensaurem Ammon führe ich im Texte nicht an, da dieselben vollkommen unwichtig sind.

[3] Als solches wurde der aus einer Kultur von Bacillus pyocyaneus Ernst isolierte Farbstoff verwendet. Derselbe dient hier als Indikator.

die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt ist und schön grün fluoresciert. Nach dem Ansäuren mit 0,1% conc. Schwefelsäure, worauf jede Fluorescenz verschwindet, wird die Lösung auf bekannte Weise sterilisiert und geimpft.

Die Kulturflüssigkeit trübt sich rasch und zeigt am 3. Tage in den obersten Flüssigkeitsschichten die grüne Fluorescenz. Beim Umschütteln verschwindet dieselbe, um am nächsten Tage in gleicher Weise wieder sichtbar zu werden. Nach weiteren 24 Stunden fluoresciert jedoch die ganze Nährlösung prächtig moosgrün. Die Intensität der Färbung ist gerade so stark wie sie vor dem Zusatz der Schwefelsäure und vor der Impfung war.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Nährflüssigkeit wird stark getrübt. Nach Verlauf von 14 Tagen klärt sich die Lösung wieder, unter Abscheidung eines starken Sediments; sie zeigt eine deutlich gelbgrüne Fluorescenz[1].

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird rasch getrübt. Farbstoffbildung ist nicht zu beobachten.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Kulturflüssigkeit wird unbedeutend getrübt.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Kultur zeigt das gleiche Verhalten wie ohne Magnesiumsulfat allein.

Die Versuche mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat zeigen nur eine Trübung der Flüssigkeit und nicht die geringste Pigmentbildung.

Bacterium syncyaneum α.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Am 3. Tag erscheint im Innern der Gelatine unterhalb der Kultur eine schwache, schön himmelblaue Fluorescenz, die in den nächsten Tagen in's Innere des Nährsubstrates vordringt. Am 5. Tage fängt das Substrat an, sich gelb zu färben und grün zu fluorescieren. Nach weiteren 48 Stunden ist die ganze Gelatine gelb gefärbt und zeigt schön moosgrüne Fluorescenz. In einer 3 Wochen alten Kultur ist neben einer deutlichen Orangefärbung der Kultur noch ein braunschwarzer Farbstoff zu beobachten. Diese letzte Färbung ist nur undeutlich sichtbar und nimmt in den nächsten Wochen langsam an Stärke zu.

[1] Auf Gelatine übergeimpft wächst die Kolonie wie vorher ohne Farbstoffbildung.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Nach 48 Stunden ist die blaue Fluorescenz dort sichtbar, wo die Bakterienmasse am breitesten ist; wächst der Impfstrich in seiner ganzen Länge gleichmässig, so tritt auch die Fluorescenz überall gleichzeitig auf. Am 4. Tage beginnt die grüne Fluorescenz, verbunden mit einer Gelbfärbung der Gelatine, zuerst an der dünnsten Stelle des Nährbodens aufzutreten, dann aber rasch weiterhin sichtbar zu werden, so dass schon am anderen Tage fast die ganze Gelatine grün fluoresciert und nur noch tief im Innern des Substrates die blaue Färbung bestehen bleibt. Fast um dieselbe Zeit erscheint an der gleichen Stelle wie die blaue Fluorescenz der braunschwarze Farbstoff. Die Bildung dieses letzteren Pigments geht nur äusserst langsam vor sich und ist noch nach 4 Wochen wenig davon sichtbar. Etwas später lässt sich an der Oberfläche des Substrates eine Orangefärbung und dunklere Fluorescenz erkennen.

Agar alkalisch. Strichkultur: Die blaue und grüne Fluorescenz ist undeutlich sichtbar. Schon am 4. Tage beginnt der braunschwarze Farbstoff aufzutreten. Der ganze Nährboden ist in kurzer Zeit durch denselben dunkel gefärbt.

Kartoffelkultur: Die Kolonie wächst mit gelblicher Farbe und ist auf die Impfstelle beschränkt. Die ganze Umgebung nimmt eine diffus graublaue Färbung an.

Gelatine alkalisch. Völlig gerade erstarrt. Impfstrich überall gleichstark: 1) Reagensglaskultur: Nach 3 Tagen ist überall zu gleicher Zeit etwas unterhalb der Kolonie die blaue Fluorescenz sichtbar. 2 Tage darauf beginnt in derselben Weise die grüne Färbung aufzutreten und langsam in's Innere vorzudringen. Zugleich färbt sich die Gelatine gelb. Einige Wochen später ist im durchfallenden Lichte der braune Farbstoff unbedeutend sichtbar.

2) Plattenkultur: Die Kultur zeigt das gleiche Verhalten wie die vorige. Die grüne Fluorescenz tritt nur 24 Stunden früher auf wie dort.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Die Kolonie breitet sich rasch vom Impfstrich aus und zeigt eine blaue Färbung. Am 3. Tag erscheint die blaue Fluorescenz, verschwindet aber schon am Tage darauf. Zugleich beginnt der stahlblaue Farbstoff aufzutreten. Nachdem derselbe in den nächsten Tagen an Stärke zugenommen hat, zeigt er nach 14 Tagen eine mehr schwarzbraune Färbung. Später ist die blaue, dann die grüne Fluorescenz sichtbar. In 1 Monat alter Kultur ist der braune Farbstoff nur

undeutlich zu erkennen, die ganze Gelatine ist gelb gefärbt und fluoresciert grün.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Strichkultur: Die Ausbreitung des Impfstriches erfolgt hier wie auf Traubenzucker-freier Nährgelatine. Die einzelnen Färbungen treten hier in der gleichen Reihenfolge auf wie in der vorigen Kultur.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: Das Wachstum ist wie auf 2% Traubenzuckergelatine. Nach 4 Tagen tritt der stahlblaue Farbstoff mit grosser Deutlichkeit auf und dringt langsam in den Nährboden vor. Später zeigt er eine mehr braunschwarze Färbung und kurz nachher ist die blaue und darauf die grüne Fluorescenz zu erkennen.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Die Kolonie breitet sich ziemlich rasch über den Impfstrich aus. Am 2. Tage zeigt sich die blaue Fluorescenz und nach weiteren 2 Tagen der schwarze Farbstoff. Dieser nimmt in den nächsten 8 Tagen bedeutend an Stärke zu. An Stelle der blauen Fluorescenz ist inzwischen die grüne getreten und der Nährboden zeigt eine braungelbe Farbe.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Die Ausbreitung der Kolonie auf dem Substrat erfolgt in gleicher Weise wie auf reiner Gelatine. Nach 12 bis 24 Stunden ist die blaue und nach 48 Stunden die grüne Fluorescenz sichtbar. Diese dringt sehr rasch nach unten hin vor. Zugleich ist eine Gelbfärbung des Nährbodens zu beobachten. In älteren Kulturen ist die Fluorescenz fast vollständig verblasst. Stahlblaues Pigment kann nicht beobachtet werden.

Getatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Die Kolonie zeigt eine rasche Ausbreitung und ist von dunkelbraunroter Farbe. Der Nährboden selbst ist tief braunrot gefärbt. Blaue und grüne Fluorescenz kann nur wenig, der stahlblaue Farbstoff überhaupt nicht beobachtet werden.

Gelatine sauer. Strichkultur: Die Kolonie breitet sich langsam über den Impfstrich aus, erhebt sich stark über das Substrat und zeigt einen glatten Rand. Am Anfang besitzt der Belag eine dunkelblaue, später eine mehr grüngelbe Farbe. Am 3. Tage erscheint der stahlblaue Farbstoff zuerst unter der breitesten Stelle des Impfstriches, dringt in das Substrat rasch vor, wodurch dasselbe sehr stark gefärbt wird. Später nehmen die obersten Schichten der Gelatine eine mehr braunschwarze Färbung an und nach 8 Tagen ist an derselben Stelle die blaue, nachher die grüne Fluorescenz sehr schön und deutlich zu beobachten. Je weiter diese

grüne Fluorescenz ins Innere des Substrates vordringt, desto mehr geht die stahlblaue Farbe in braunschwarz über.

Gelatine alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der drei Impfstriche geschieht folgender Massen: In der Mitte der Gelatine wird von oben bis unten über die ganze Oberfläche hin eine Strichkultur von Bacterium syncyaneum α angelegt und rechts und links davon je ein Impfstrich von Bacillus acidi lactici. Die beiden letzteren reichen nur von oben bis in die Mitte, weshalb nur bis dahin Säureausscheidung stattfindet und auf den gebildeten Farbstoff einwirken kann. Hier zeigt sich am 3. Tage der stahlblaue Farbstoff, unten jedoch die blaue Fluorescenz. Im weiteren Verlauf nimmt das stahlblaue Pigment stets an Stärke zu und an Stelle der blauen Fluorescenz tritt die grüne. Mit letzterer Färbung ist das Auftreten des gelben Farbstoffes verbunden. Diese Verhältnisse sind einige Tage in vollster Schärfe sichtbar. Später tritt infolge von Diffusionserscheinungen eine Vermischung der Stoffwechselprodukte ein.

Kulturen in Nährlösungen mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: Die Nährlösung trübt sich rasch und zeigt am 3. Tage in den obersten Flüssigkeitsschichten die grüne Fluorescenz. Diese Färbung schreitet rasch nach unten zu vor und ist bald in der ganzen Kultur sichtbar. Eine 2 Monate alte Kultur zeigt unverändert die gelbe Farbe und grüne Fluorescenz. Der stahlblaue Farbstoff ist nicht sichtbar.

Mit bernsteinsaurem Ammonium: Am 3. Tage ist an der Oberfläche der stark getrübten Flüssigkeit grüne Fluorescenz deutlich zu erkennen. Nach 24 Stunden ist an derselben Stelle der schwarze Farbstoff wahrzunehmen. Beide Färbungen nehmen in den nächsten Tagen an Stärke zu. Nach 14 Tagen ist die Lösung braungelb gefärbt und zeigt nur noch undeutlich die grüne Fluorescenz.

Mit Harnstoff und Mannit: Die Kulturflüssigkeit zeigt nur geringe Trübung und keine Spur von Farbstoff.

Mit Harnstoff und Traubenzucker: Am 2. Tage ist direkt an der Oberfläche der sonst klaren Nährlösung eine zusammenhängende, ungefähr $^1/_2$ cm dicke Bakterienschicht und zugleich blaue Fluorescenz sichtbar. Am nächsten Tage ist dieselbe verschwunden, und der stahlblaue Farbstoff beginnt dort ungemein prächtig aufzutreten. Dieser nimmt rasch an Stärke zu und dringt

tiefer nach unten hin vor. Nach 14 Tagen jedoch färbt sich die Lösung braunschwarz und lässt nur noch an der Oberfläche einen dunkelblauen Streifen erkennen. Schliesslich verschwindet auch dieser, und die Kultur besitzt dann ungefähr die gleiche Färbung wie die in bernsteinsaurem Ammon.

Mit citronensaurem Ammonium: Die Nährflüssigkeit trübt sich unbedeutend. Am 4. Tage beginnt der schwarze Farbstoff aufzutreten. Eine ältere Kultur besitzt eine hellbraune Farbe und zeigt keine Spur von fluorescierendem Pigment. Die Flüssigkeit hat sich geklärt und ein weisses Sediment abgeschieden.

Mit weinsaurem Ammonium: Die Trübung ist die gleiche wie in der vorigen Nährlösung. Am 4. Tage zeigt sich in den obersten Flüssigkeitsschichten deutlich die grüne Fluorescenz und 3 Tage später auch das schwarze Pigment. Nach 14 Tagen hat sich ein gelblichweisses Sediment abgeschieden, die Flüssigkeit ist klar, gelbbraun gefärbt und lässt nur geringe Fluorescenz erkennen.

Mit buttersaurem Calcium: Die Flüssigkeit bleibt klar und zeigt keine Färbung.

Mit milchsaurem Ammonium: In dieser Kultur ist die Entwicklung des Bakteriums die gleiche wie in bernsteinsaurem Ammon.

Mit ameisensaurem Ammon: Es ist nur geringe Trübung und keine Farbstoffproduktion zu beobachten.

Mit Asparagin und 0,1% Phosphorsäure[1]: Am 2. Tage zeigt sich in der obersten Flüssigkeitsschicht der stahlblaue Farbstoff. Am nächsten Tage erscheint an derselben Stelle die grüne Fluorescenz. Beim Umschütteln nimmt die ganze Nährlösung eine gelbgrüne Farbe an. Nach Zusatz von 0,1% conc. Schwefelsäure verschwindet jede Spur von grünem Pigment, und der stahlblaue Farbstoff erscheint sofort in voller Deutlichkeit. Nach 24 Stunden tritt wie vorher die Grünfärbung auf, und Säurezusatz bewirkt wieder die gleiche Veränderung.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die grüne Fluorescenz ist am 2. Tage an der Oberfläche der Kulturflüssigkeit sichtbar. An demselben Tage tritt auch der schwarze Farbstoff auf; derselbe

[1] spec. Gewicht 1,7. Hier wurde nicht wie bisher Schwefelsäure, sondern Phosphorsäure zum Ansäuren der Nährlösung verwendet, da in erster nur geringes Wachstum und keine Pigmentbildung zu beobachten war.

nimmt rasch an Stärke zu und die ganze Nährlösung ist nach kurzer Zeit gefärbt. Fluorescenz ist dann nicht mehr sichtbar.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Die Flüssigkeit trübt sich und zeigt eine leichte Rosafärbung. Nach 14 Tagen ist dieselbe verschwunden, die Nährlösung hat sich geklärt und ein unbedeutendes Sediment abgeschieden.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Die Nährlösung wird unbedeutend getrübt. Farbstoffbildung findet nicht statt.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Kultur zeigt dasselbe Verhalten wie eine solche ohne Magnesiumsulfat allein.

Lösung mit 0,00125% Kaliumphosphat: In den ersten Tagen ist sehr deutlich die grüne Fluorescenz zu beobachten. Nach 8 Tagen beginnt langsam der schwarze Farbstoff aufzutreten und die Flüssigkeit zeigt dann eine blaugrüne Farbe. Später ist das Aussehen der Kultur das gleiche wie in weinsaurem Ammonium.

Lösung mit 0,0025% Magnesiumsulfat: Die Nährlösung zeigt dasselbe Verhalten wie die ohne Chlorcalcium.

Bacterium syncyaneum β.

Gelatine alkalisch. Stichkultur: Unterhalb der weisslichen Kolonie ist am 4. Tag das Auftreten eines braunschwarzen Farbstoffes zu beobachten, der sowohl im auffallenden wie durchfallenden Lichte sichtbar ist. Die Farbstoffbildung nimmt in den nächsten Tagen bedeutend zu, und das braunschwarze Pigment dringt immer tiefer in das Substrat vor.

Gelatine alkalisch. Strichkultur: Am 3. Tage ist zuerst unter der breitesten Stelle der Kultur und etwas im Innern der Gelatine der braunschwarze Farbstoff zu bemerken, einige Tage später jedoch im ganzen Verlauf des Impfstriches. Das Pigment dringt stets weiter in den Nährboden vor und färbt nach 14 Tagen denselben braunschwarz.

Agar alkalisch. Strichkultur: Nach 48 Stunden lässt sich eine Braunfärbung des Substrates beobachten. Dieselbe nimmt rasch zu, so dass innerhalb 8 Tagen der Farbstoff überall in der Kultur sichtbar ist.

Kartoffelkultur: Die Kolonie ist gelb gefärbt und hat sich etwas über den Impfstrich ausgebreitet. Die Kartoffel selbst nimmt eine graublaue Färbung an.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Stichkultur: Von der Einstichstelle breitet sich eine weisse, später dunkelblau gefärbte

Auflagerung ziemlich rasch über die Oberfläche aus. Am 4. Tage ist unterhalb der Kolonie ein stahlblauer Farbstoff zu beobachten. Diese Färbung wird täglich intensiver und dringt zugleich langsam in das Substrat vor. Nach 3 Wochen zeigt der Farbstoff eine mehr braunschwarze Farbe und hat schliesslich das gleiche Aussehen, wie das in alkalischer Gelatine von Anfang an entstehende Pigment.

Gelatine mit 2% Traubenzucker. Strichkultur: Die Ausbreitung der Kolonie ist vollständig die gleiche wie auf Gelatine ohne Traubenzuckerzusatz. Die Farbe derselben ist blaugrau. Der am 3. Tage auftretende Farbstoff ist prachtvoll stahlblau und in keinem andern Nährsubstrat mit gleicher Stärke zu beobachten. Dieses Pigment dringt in den nächsten Tagen immer tiefer in das Substrat vor und hat inzwischen eine mehr schwarze Färbung angenommen. Später ist zwischen ihm und dem in alkalischer Nährgelatine entstehenden Farbstoff nicht der geringste Unterschied mehr zu beobachten.

Gelatine mit 4% Traubenzucker. Stich- und Strichkultur: Die Entwicklung des Organismus ist hier wie in 2% Traubenzuckergelatine, nur bleibt der stahlblaue Farbstoff länger wie dort unverändert sichtbar.

Gelatine mit Resorcin. Strichkultur: Trotz der guten Entwicklung des Bakteriums ist in den ersten 5 Tagen keine Spur von Pigment sichtbar. Nach dieser Zeit nimmt die Gelatine eine leicht rotbraune Färbung an und schliesslich lässt sich im durchfallenden Lichte das Auftreten des schwarzen Farbstoffes schwach und undeutlich beobachten. Eine 4 Wochen alte Kultur ist tief goldgelb gefärbt. Von der schwarzen Färbung ist nichts mehr sichtbar.

Gelatine mit ameisensaurem Natrium. Strichkultur: Das Wachstum, die leichte Rotbraunfärbung und das nur unbedeutende Auftreten des schwarzen Pigments ist hier ähnlich wie bei der vorigen Kultur, mit dem einen Unterschiede jedoch, dass die Kolonie weniger konsistent wird und auf dem Nährboden herabgleitet.

Gelatine mit Hydrochinon. Strichkultur: Das Wachstum ist nur gering. Eine Färbung des Substrates ist nicht zu erkennen.

Gelatine sauer. Strichkultur: Die Kolonie dehnt sich nur langsam jedoch bis zu ½ cm Breite über den Impfstrich aus. Sie ist zuerst tiefblau, später in der Mitte des Striches dunkel — bis schwarzgrau, an den beiden Seiten hellgrau gefärbt. Trotz des unbedeutenden Wachstums ist am 3. Tage der stahlblaue Farbstoff

sehr intensiv entwickelt. In den nächsten Tagen nimmt diese Färbung so rasch an Ausdehnung zu, dass fast der ganze Nährboden nicht mehr stahlblau, sondern schwarzbraun gefärbt.

Gelatine alkalisch. Strichkultur zusammen mit einem Säurebildner: Die Anlage der 3 Impfstriche geschieht nach der im allgemeinen Teil angeführten Methode. Die beiden Impfstriche des Säurebildners werden jedoch nicht längs der ganzen Kultur von Bacterium syncyaneum, sondern nur etwa von der Mitte aus nach unten zu ausgeführt, so dass oben der Bacillus der blauen Milch für sich allein wächst und nur im unteren Teile der Einwirkung des sauren Stoffwechselproduktes des Bacillus acidi lactici ausgesetzt ist. Bei dieser Anordnung ist am 3. Tage in dem oberen Teile der Kultur eine Schwarzfärbung, im unteren Teile hingegen infolge der Einwirkung der freien Säure eine schön stahlblaue Färbung des Nährbodens zu beobachten. Diese beiden Farben nehmen in den nächsten Tagen an Intensität zu. Später wird jedoch infolge Diffusionserscheinungen der Versuch undeutlich.

Kultur in Nährlösung mit verschiedenen organischen Nährstoffen.

Mit Asparagin: Die Nährlösung wird am 4. Tage unbedeutend getrübt. Die Trübung nimmt in den nächsten Tagen bedeutend an Stärke zu. Später verschwindet dieselbe wieder, die Flüssigkeit ist vollständig klar geworden und hat ein reichliches Sediment abgeschieden. Farbstoffproduktion ist nicht zu beobachten.

Mit bernsteinsaurem Ammonium: Nach 2 Tagen ist die Flüssigkeit stark getrübt und zeigt am 5. Tage eine leichte Rosafärbung. Diese verschwindet in der nächsten Zeit vollständig, und die Nährlösung besitzt dann eine schwache schwärzlich braune Farbe. Nach 1 Monat ist die Kultur stark getrübt, schleimig und hat ein reichliches Sediment abgeschieden. Der Farbstoff ist nur noch sehr undeutlich sichtbar.

Mit Harnstoff und Mannit: Die Flüssigkeit bleibt klar und farblos.

Mit Harnstoff und Traubenzucker: Die Nährlösung wird schwach getrübt, ist schleimig und scheidet nach 1 Monat ein unbedeutendes Sediment ab. Am 7. Tage ist die Flüssigkeit leicht rosa gefärbt. 2 Tage darauf tritt an der Oberfläche der stahlblaue Farbstoff auf, der dann weiter nach unten vordringt. Die Rosafärbung verschwindet infolge dessen mehr und mehr. Nach 14 Tagen

bis 3 Wochen ist die Flüssigkeit intensiv braunschwarz gefärbt und zeigt nur noch in der obersten Schicht die blaue Färbung.

Mit citronensaurem Ammon oder mit weinsaurem Ammon: Zuerst trübt sich die Flüssigkeit, wird jedoch nach 3 Wochen wieder fast klar und hat ein reichliches Sediment abgeschieden. Am 5. Tage ist eine leichte Rosafärbung, später das Auftreten des braunschwarzen Pigments zu beobachten. Letzteres wird nur in sehr geringer Menge gebildet. Die Farbe einer 4 Wochen alten Kultur ist bräunlich-gelb.

Mit milchsaurem Ammonium: Die Flüssigkeit trübt sich rasch. Noch nach 5 Wochen ist keine Klärung eingetreten. Zuerst färbt sich die Nährlösung leicht rosa, später deutlich gelbgrün[1], zeigt jedoch keine Spur von Fluorescenz. Diese gelbe Farbe geht mit der Zeit in braungelb über.

Mit ameisensaurem Ammonium: Die Lösung wird unbedeutend getrübt. Farbstoff wird nicht gebildet.

Mit Asparagin und 0,1% Phosphorsäure[2]: Am Anfang ist eine geringe Blaufärbung zu erkennen, die in den nächsten Tagen trotz des guten Wachstums des Organismus nur langsam an Deutlichkeit zunimmt. Nach einigen Tagen reagiert die Flüssigkeit alkalisch. Fluorescenz ist nicht zu beobachten.

Kulturen in Nährlösungen mit Variierung der Nährsalze.

Lösung ohne Chlorcalcium: Die Flüssigkeit trübt sich stark. Nach 14 Tagen beginnt dieselbe sich von oben her aufzuklären und es setzt sich ein reichliches Sediment zu Boden. In den ersten 7 Tagen ist keine Pigmentbildung zu beobachten. Dann zeigt sich oben eine 1 cm breite Zone, die tief schwarz gefärbt ist. Langsam dringt dieser Farbstoff nach unten hin vor und die Nährlösung besitzt nach 3 Wochen eine tiefe braungelbe Farbe.

---

[1] Die hier beobachtete Färbung der Flüssigkeit ist vollkommen die gleiche, wie sie sich bei Bacterium syncyaneum α in einzelnen Nährlösungen beobachten lässt. Impft man von dieser Kultur auf schräg erstarrte Gelatine über, so wird zuerst der braunschwarze Farbstoff gebildet. Nach 5 Tagen jedoch ist deutlich die blaue und später die grüne Fluorescenz sichtbar, die nach einiger Zeit wieder verschwindet. Hiermit ist unzweideutig der Weg angegeben, auf welchem es möglich ist, dem Organismus seine in der Kultur verloren gegangene Fähigkeit, den fluorescierenden Farbstoff zu bilden, wiederzugeben. Doch wurden die Versuche nicht weiter fortgesetzt.

[2] Aus demselben Grunde wie bei der α-Varietät wird auch hier an Stelle der Schwefelsäure Phosphorsäure zum Ansäuren der Nährlösung verwendet.

Lösung ohne Magnesiumsulfat: Nach einigen Tagen trübt sich die Kulturflüssigkeit, um später unter Ausscheidung eines Sediments wieder fast klar zu werden. Farbstoff wird nicht gebildet.

Lösung ohne Kaliumphosphat: Es ist eine unbedeutende Trübung und keine Farbstoffbildung zu beobachten.

Lösung ohne Chlorcalcium und Magnesiumsulfat: Die Entwicklung des Bakteriums ist die gleiche wie die in der Lösung ohne Magnesiumsulfat allein.

Lösung mit 0,00125% Kaliumphosphat: Die Flüssigkeit trübt sich, klärt sich später wieder und hat dann ein reichliches Sediment abgeschieden. In einer 6tägigen Kultur tritt eine schön rosa Färbung auf, die in den nächsten 5 Tagen bedeutend an Intensität zunimmt. Später färbt sich die Lösung etwas bräunlich, lässt jedoch nach 1 Monat deutlich die Rosafärbung erkennen.

Lösung mit 0,0025% Magnesiumsulfat: Die Nährlösung wird am Anfang getrübt, später jedoch klärt sie sich wieder nach Abscheidung eines reichlichen Sediments. Nach 8 Tagen tritt in der obersten Flüssigkeitsschicht das schwarze Pigment auf. Nach 1 Monat zeigt die Kultur eine tief dunkelbraune Farbe. Die Intensität ist schwächer als die in einer Kultur mit Harnstoff und Traubenzucker, aber stärker als die einer solchen ohne Chlorcalcium.

Eigenschaften des Farbstoffes.

Bei der Vergleichung der auf die früher angegebene Weise[1] erhaltenen Farbstoffe der verschiedenen fluorescierenden Bakterienarten stellte sich heraus, dass ein Unterschied zwischen ihnen in keiner Hinsicht gefunden werden konnte.

Es wurden die Farbstoffe von Bacillus fluorescens tenuis, Bacillus fluorescens putidus, Bacillus fluorescens albus, Bacillus erythrosporus, Bacillus viridans, Bacillus pyocyaneus Ernst und Bacterium syncyaneum Varietät α untersucht. Sie zeigten sich sämtlich völlig gleichartig, mochten sie aus sauren oder alkalischen Nährlösungen stammen; es kommen ihnen folgende Eigenschaften zu:

Der Farbstoff stellt ein citronengelbes, amorphes Pulver dar, welches an der Luft rasch feucht wird. Auf dem Platinblech erhitzt, verkohlt derselbe und entwickelt hierbei reichliche, nach verbrannten Haaren riechende Dämpfe. Bei weiterem Erhitzen verbrennt derselbe ohne jeden Rückstand[2]. Er ist in jeder Menge Wasser, sowie in Glycerin löslich. Die wässrige Lösung ist an der Luft wie in geschlossenem Glase unbegrenzte Zeit haltbar und wird nie gelatinös. In absolutem und 96% Alkohol ist er vollständig unlöslich, in 85% hingegen in geringem Masse löslich und die Löslichkeit nimmt bei steigendem Wassergehalt stetig zu. In Aether, Schwefelkohlenstoff, Chloroform und Benzol ist er vollständig unlöslich.

Die concentrierte wässrige Lösung ist von dunkelorange bis rotbrauner Farbe und zeigt im auffallenden Licht eine rein blaue Fluorescenz. Bei weiterer Verdünnung wird die Farbe gelb und verschwindet zuletzt, doch die blaue Fluorescenz bleibt in beiden Fällen noch deutlich sichtbar. Durch Einwirkung irgend eines

[1] vergl. Methoden der Untersuchung

[2] die vollständige Flüchtigkeit ist zugleich ein Zeichen, dass das Pigment von anorganischen Stoffen völlig frei ist.

Alkalis wie die Hydroxyde des Kaliums, Natriums, Ammoniums, Bariums, Calciums, geht die blaue Fluorescenz in sämtlichen drei Concentrationsgraden in grün über; die orangerote Färbung bleibt hierbei unverändert, die gelbe Farbe wird etwas dunkler und in der farblosen Lösung tritt ein gelblicher Ton auf. Bei vorsichtigem Zusatz irgend einer Säure verschwinden zunächst die Veränderungen, welche das Alkali hervorgerufen hatte, bei weiterem Hinzufügen von Säure auch die Fluorescenz.

Verdünnte Säuren wirken auf eine orangerote oder gelbe, wässrige Lösung in keiner Weise verändernd ein und heben nur, wie eben erwähnt, die Fluorescenz auf. Concentrierte Säuren wie Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure, bewirken jedoch eine Missfärbung, welche bei Zusatz von Alkali wieder verschwindet und bei weiterem Zusatz der ursprünglichen Fluorescenzerscheinung Platz macht. Schweflige Säure verhält sich wie eine concentrierte Säure; Alkali hebt die entstandene Missfarbe auf und stellt die ursprüngliche Färbung wieder her.

Chlorwasser bewirkt nicht sofort, sondern erst nach einigen Sekunden eine vollständige Zerstörung des Farbstoffes.

Gegen Reduktionsmittel zeigt sich das Pigment beständig.

Nach der qualitativen Analyse enthält der Farbstoff: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff (vielleicht auch Schwefel); seinem chemischen Verhalten nach müsste er in die Verwandtschaft der Eiweisskörper eingereiht werden.

Ergebnisse der Untersuchung.

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt die Ausführung und der Verlauf der einzelnen Versuche beschrieben worden sind, handelt es sich nun darum, die gefundenen Thatsachen zusammenzufassen, das Verhalten der einzelnen fluorescierenden Arten mit einander zu vergleichen und das bisher Bekannte kritisch zu sichten. Hierbei möchte ich jedoch zunächst nicht sämtliche zur Untersuchung herangezogene fluorescierende Arten besprechen, sondern vor der Hand von Bacterium syncyaneum absehen, da sich dasselbe von den übrigen Arten durch seine Fähigkeit, noch ein stahlblaues Pigment zu bilden, unterscheidet.

Sämtliche fluorescierende Arten zeigen bei dem Auftreten der einzelnen Färbungen in den verschiedenen Nährmedien die grösste Übereinstimmung.

In der Gelatinekultur erscheint stets zuerst eine schön himmelblaue Fluorescenz. Dieselbe ist nur im auffallenden Lichte sichtbar. Der Nährboden selbst zeigt im durchfallenden Lichte betrachtet nicht die geringste Veränderung. Nach einigen Tagen, je nach der vorliegenden Art, bald früher, bald etwas später, tritt als weitere Färbung eine prächtig moosgrüne Fluorescenz auf. Auch diese Erscheinung ist nur im auffallenden Lichte sichtbar. Im durchfallenden Lichte hingegen lässt sich zugleich eine citronengelbe Färbung des Nährsubstrats erkennen. Nach 14 Tagen bis 3 Wochen färbt sich die Gelatine von der Oberfläche her stets dunkler, besitzt schliesslich eine tief orangerote Farbe und zugleich ist an Stelle der moosgrünen Fluorescenz eine dunkelgrüne getreten. Von diesem eben geschilderten Verhalten weichen allerdings einige Arten innerhalb enger Grenzen ab. So ist in einer Kultur von Bacillus fluorescens putidus nur die blaue und moosgrüne Fluorescenz, sowie der gelbe Farbstoff zu erkennen, indem auch in den ältesten Kulturen weder

eine Dunklerfärbung des Nährbodens, noch eine dunkelgrüne Fluorescenz zu beobachten ist. Ausserdem lassen die Gelatine verflüssigenden Arten geringe Abweichungen erkennen, die jedoch lediglich auf die veränderte Beschaffenheit des Nährbodens zu schieben sind, und mit Ausnahme von Bacillus pyocyaneus Ernst sind hierbei die gleichen Färbungen wie bei den andern nicht verflüssigenden Arten zu erkennen. Dieser Organismus zeigt jedoch zuerst zwar gleichfalls die blaue Fluorescenz und später eine Gelbdann Orangefärbung der Kultur, doch ist noch nach mehreren Wochen keine moosgrüne, sondern stets nur eine blaugrüne Fluorescenz sichtbar.

Auf Agar ist das Verhalten sämtlicher Arten das gleiche. Die zuerst auftretende blaue Fluorescenz ist meist nur kurz und undeutlich zu erkennen, indem gewöhnlich schon am 3. Tage die grüne Fluorescenz aufzutreten beginnt und am Tage darauf in der ganzen Kultur sichtbar ist. Ältere Kulturen zeigen gleichfalls eine Dunklerfärbung, sowie eine dunkelgrüne Fluorescenz.

In Bouillon bilden diese Arten scheinbar nur den grün fluorescierenden Farbstoff. Eine ältere Kultur ist stets dunkler gefärbt und lässt nur noch wenig Fluorescenz erkennen.

Eine Kartoffelkultur zeigt von sämtlichen, seither beschriebenen Nährmedien ein vollständig verschiedenes Verhalten. Nicht nur ist das Wachstum der einzelnen Arten im Verhältnis zur Gelatine- oder Agarkultur ein ganz unbedeutendes, sondern die Auflagerung zeigt auch eine gelbe, gelbbraune oder bräunliche Farbe, während die Kolonien auf anderen festen Nährböden weiss sind. Ausser diesem Farbstoff ist noch bei wenigen Arten (Bacillus pyocyaneus) nach einiger Zeit eine grünliche Färbung des Substrates zu erkennen.

Die Färbungen, welche in den verschiedenen Kulturen erscheinen, sind mithin folgende:

in Gelatine und Agar:

1) eine blaue Fluorescenz;
2) eine moosgrüne Fluorescenz und ein gelber Farbstoff;
3) eine dunkelgrüne Fluorescenz und ein orangeroter Farbstoff;

in Bouillon:

Mit Ausnahme der blauen Fluorescenz sämtliche Färbungen wie in Gelatine.

auf Kartoffel:

4) ein bräunlichgelber Farbstoff; selten grüne Fluorescenz.

Sämtliche fluorescierende Bakterien zeigen mithin in den verschiedenen Nährmedien das gleiche Verhalten wie Bacillus pyo-

cyaneus bezüglich ihrer Fähigkeit gefärbte Stoffwechselprodukte zu bilden. Infolge dieser Übereinstimmung mit Bacillus pyocyaneus musste auch bei den anderen Arten angenommen werden, dass die in den Gelatine, Agar und Bouillon auftretenden Färbungen auf 3 verschiedene Farbstoffe zurückzuführen seien und zwar würde dann bei ihnen die himmelblaue Fluorescenz mit dem Pyocyanin, die in älteren Kulturen auftretende braunrote Färbung mit der Pyoxanthose, die grüne Fluorescenz mit der des Bacillus pyocyaneus zu vergleichen sein. Die auf Kartoffeln sichtbare Färbung wäre einem 4. Farbstoff zuzuschreiben, entsprechend dem Pyoxanthin des Bacillus pyocyaneus.

Da nun nach der Ansicht von Ledderhose und Kunz Pyocyanin nicht direkt gebildet wird, sondern erst aus Leukofarbstoff durch Einwirkung des Sauerstoffes der Luft entsteht, ferner die gleichen Forscher die Pyoxanthose als Oxydationsprodukt des Pyocyanin's auffassen, so wurde ich veranlasst, Versuche mit Nährmedien anzustellen, denen reducierende Substanzen zugesetzt waren, um diesen Fragen näher zu kommen. Auch Nägeli ist ja der Ansicht gewesen, dass sämtliche Färbungen, die in Kulturen von fluorescierenden Bakterien auftreten, überhaupt nur auf Oxydationserscheinungen zurückzuführen seien. Alle diese Versuche jedoch fielen nicht befriedigend aus, und kein einziger ergab ein positives Resultat. Dass ich dieselben trotzdem anführe, geschieht aus dem Grunde, weil die fluorescierenden Bakterien in diesen Nährmedien oft sehr interessante biologische Eigenschaften zeigen und namentlich das Wachstum der Kolonien bei manchen Arten so charakteristisch ist, dass es als wichtiges diagnostisches Merkmal bei nahe verwandten Formen dienen kann.

Dieses negative Resultat bei Benützung von Nährböden mit reducierenden Substanzen wird erklärlich durch den Zusammenhang zwischen den einzelnen Färbungen, wie er sich später nach der Isolierung des Pigmentes herausstellte. Bei der Darstellung des Farbstoffes aus Nährlösungen erhielt ich stets nur einen Farbstoff. Derselbe ist ein gelbes Pulver, in Wasser und Glycerin löslich, in allen anderen Lösungsmitteln hingegen unlöslich. Die concentrierte wässrige Lösung ist orangerot, die verdünnte gelb. Beide zeigen eine blaue Fluorescenz. Dieselbe geht durch Zusatz irgend einer Base in grün über und zwar bei der concentrierten Lösung in dunkelgrün und bei der verdünnten Lösung in moosgrün.

Nie gelang es mir, einen anderen Farbstoff als den eben genannten aus einer Nährlösung zu isolieren, obgleich ich bei jeder Bakterienart das Pigment in den verschiedensten Nährlösungen untersuchte. Es war vollkommen gleichgültig, ob die Kulturflüssigkeit

alkalisch oder sauer reagierte, viel oder wenig Phosphat[1], bernsteinsaures Ammon oder eine andere organische Verbindung als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle enthielt. Infolge dessen ist die Annahme berechtigt, dass die in den verschiedenen Nährböden auftretenden Färbungen nur von diesem einzigen Farbstoff abzuleiten und nicht auf Oxydationserscheinungen zurückzuführen sind. Die Resultate, welche bei den verschiedenen Versuchen erhalten wurden, lassen sich auch nur durch diese Annahme in befriedigender Weise erklären.

Aber auch von Bacillus pyocyaneus β konnte ich aus den verschiedensten Nährlösungen nur den einen Farbstoff isolieren. Es steht dieses Resultat mit allen bisher erhaltenen Versuchen im Widerspruch, indem die verschiedenen Forscher zum mindesten 2, andere jedoch 3 und 4 Pigmente isolieren konnten. Ich möchte dies jedoch dadurch erklären, dass sie zur Kultur solche Nährmedien benützten, welche complicierte organische Verbindungen enthielten, wodurch die Isolierung des Farbstoffes mit grossen Schwierigkeiten verknüpft war. Die Farbstoffe wurden nämlich in der Regel aus Agar, Gelatine oder Bouillon isoliert. Auch die Möglichkeit ist vorhanden, dass bei der Zersetzung des Eiweissmoleküls leicht andere gefärbte Körper in geringer Menge gebildet werden, die in den von mir verwandten Nährlösungen nicht entstehen können.

Für die Annahme, dass die sämtlichen Färbungserscheinungen nur auf einen einzigen Farbstoff zurückzuführen seien, spricht die Thatsache, dass dieser eine Farbstoff je nach der Concentration und Alkalität alle Färbungen zeigt, die in Gelatine und anderen alkalischen Nährböden auftreten können, sowie dass er in einer verhältnismässig grossen Menge gebildet wird.

Da jedoch der gleiche Farbstoff auch in sauren Nährmedien gebildet wird, verursacht derselbe ohne Zweifel auch die auf der Kartoffel auftretende Gelbfärbung der Auflagung. Ein weiterer Beweis hierfür ist das Verhalten der Kultur in saurer Gelatine resp. Agar.

Beim Vergleich der aus den Kulturen der einzelnen fluorescierenden Arten erhaltenen Farbstoffe lässt sich zwischen ihnen weder physikalisch noch chemisch der geringste Unterschied erkennen. Es ist deshalb anzunehmen, dass sämtliche fluorescierenden Arten ein und denselben Farbstoff bilden.

Wenn die Annahme richtig ist, dass die verschiedenen Färbungen nur auf ein einziges Pigment zurückzuführen sind, so bleibt

[1]) Vergl. die Arbeit Gessard und seine Ansicht über die Bedeutung der Phosphorsäure.

noch nachzuweisen, dass die grüne Fluorescenz aus der blauen thatsächlich nur durch Vermehrung des Alkaligehaltes im Nährboden entsteht und, dass das Letztere auf der Thätigkeit der fluorescierenden Bakterien beruht. Es hat sich nun herausgestellt, dass sämtliche fluorescierenden Arten Alkalibildner sind, d. h., dass sie die Fähigkeit besitzen, hoch molekulare stickstoffhaltige Substanzen zu Ammoniak zu reducieren. Diese Eigenschaft ist schon seit einiger Zeit von Bacillus pyocyaneus bekannt. Später konnte Hoffa bei Bacillus fluorescens liquefaciens die gleiche Thatsache feststellen; auch brachte er die Ammoniakproduktion in Zusammenhang mit dem Auftreten der grünen Fluorescenz. Den direkten Beweis für die Alkalibildung sämtlicher fluorescierender Bakterien konnte ich dadurch erbringen, dass ich dieselben auf sauren Nährboden (Gelatine, Agar) züchtete. Diese Nährboden werden stets nach längerer oder kürzerer Zeit deutlich alkalisch. Als äusseres Zeichen tritt dann sofort die Fluorescenz auf, die bekanntlich nur bei neutraler oder alkalischer Reaktion sichtbar ist.

In schwach alkalischen Nährboden muss zunächst stets die blaue Fluorescenz auftreten, da die Alkalität noch nicht so gross ist, um grüne Fluorescenz zu bewirken. Im weiteren Verlauf des Wachstums bildet der Organismus stets grössere Mengen Pigment und Ammoniak. Bei einer Strichkultur können diese Stoffwechselprodukte in der dickeren Gelatineschicht leicht ins Innere des Nährbodens vordringen, an der dünnsten Stelle hingegen muss zuerst eine Anreicherung dieser Stoffe stattfinden. Hierdurch ist es erklärlich, dass die grüne Fluorescenz und die Gelbfärbung der Gelatine, vollkommen unabhängig von der Grösse des Wachstums, stets an der dünnsten Stelle der Kultur zuerst sichtbar werden. Auf gerade erstarrter Gelatine, in der die Stoffwechselprodukte gleichmässig in's Innere diffundieren können, muss mithin die grüne Fluorescenz überall zu gleicher Zeit auftreten und um so früher, je dünner die Gelatineschicht ist.

Die orangerote Färbung und dunkelgrüne Fluorescenz tritt auf, wenn durch fortgesetzte Farbstoffproduktion in der Kultur eine starke Anreicherung stattgefunden hat, in derselben Weise wie eine verdünnte gelbe Lösung des Farbstoffes durch Concentration orangerot wird und auf Ammoniakzusatz dunkelgrün fluoresciert. Infolge dessen muss diese Erscheinung gleichfalls an der dünnsten Stelle der Gelatineschicht zuerst sichtbar werden. Ein weiterer Beweis dafür, dass es sich hier nicht, wie seither angenommen, um Oxydationserscheinungen handelt, ist durch das Verhalten einer Gelatinekultur von Bacillus fluorescens putidus gegeben. Hier ist, wie schon

früher erwähnt, die blaue und grüne Fluorescenz, sowie die Gelbfärbung des Substrates zu beobachten. Von den übrigen fluorescierenden Arten weicht dieser Organismus jedoch dadurch ab, dass nie ein orangeroter Farbstoff zu erkennen ist. Da nun die auftretenden Färbungen mit denen der anderen Arten vollkommen übereinstimmen, so drängt sich unwillkürlich die Frage auf, warum gerade bei diesem Organismus keine Oxydation stattfinden sollte. Es beruht eben darauf, dass diese Art nur wenig Farbstoff bildet, weshalb nie eine dunkle Färbung eintreten kann. Bei der Isolierung des Farbstoffes jedoch besitzt die concentrierte Lösung gleichfalls eine orangerote Farbe und zeigt auf Zusatz eines Alkali's dunkelgrüne Fluorescenz.

Sämtliche eben beschriebene Färbungen zeigen sich in Gelatine und Agar. In Bouillon hingegen ist eine blaue Fluorescenz nur sehr selten zu beobachten. Es liegt dies daran, dass die dunkle Farbe des Nährmediums diese Färbung leicht verdeckt.

Das Auftreten der grünen Fluorescenz ist mithin von der Ammoniakmenge abhängig. Es ist übrigens gleichgültig, durch welchen Körper die alkalische Reaktion im Nährboden herbeigeführt wird. Das von den Bakterien gebildete Ammoniak lässt sich durch jedes andere Alkalihydroxyd ersetzen. Deshalb ist der ursprüngliche Alkalitätsgrad der Nährsubstrate für das frühere oder spätere Auftreten der grünen Färbung ausschlaggebend. Je alkalischer die Gelatine von vornen herein ist, desto kürzere Zeit ist die blaue Fluorescenz zu beobachten, bis sie bei einem gewissen, sehr grossen Alkalitätsgrad gar nicht mehr auftritt, sondern sogleich durch die grüne ersetzt wird. Ebenso sind die Verhältnisse auch durch die Menge des Ammoniaks bedingt, welche von den verschiedenen fluorescierenden Arten gebildet wird. Bei ursprünglich gleich stark alkalischer Gelatine wird der stärkere Alkalibildner kürzere Zeit die blaue Fluorescenz in seinen Kulturen erkennen lassen als der schwächere Alkalibildner.

Hierdurch kommen auch die verschiedenen Nuancen in den einzelnen Nährmedien zu stande.

Bacillus pyocyaneus β ist nun ein schwacher Alkalibildner. Infolge dessen zeigt eine Gelatinekultur stets mehr blaue wie grüne Fluorescenz. Die anderen Varietäten hingegen produzieren eine reichliche Menge Ammoniak.

Bacillus pyocyaneus Varietät α und β unterscheiden sich nicht wie Ernst annimmt durch die Produktion von verschiedenen Farbstoffen, sondern nur durch die Bildung verschiedener Mengen von Ammoniak. Setzt man nämlich zu einer β-Kultur, gleichviel welchen

Alters, eine geringe Menge Ammoniakflüssigkeit hinzu, so fluoresciert die ganze Schicht wie bei Varietät α schön moosgrün. Auch das Verhalten bei Licht, das Ernst als Unterschied zwischen den beiden Varietäten angiebt, ist nach Ammoniakzusatz vollständig das gleiche.

Eine verflüssigte Kultur von Bacillus pyocyaneus zeigt bekanntlich nur an der Oberfläche grüne Fluorescenz, welche in den unteren Flüssigkeitsschichten fehlt. Beim Umschütteln einer solchen Kultur nehmen auch die unteren Schichten den gleichen Grad der Itensität in der Fluorescenz an wie die oberen. Ledderhose erklärt diese Erscheinung dadurch, dass die in den tieferen Schichten lebenden Bakterien infolge von Sauerstoffmangel das Pyocyanin ihres Bereiches zu Leukofarbstoff reducieren, welcher beim Umschütteln, mit dem Sauerstoff der Luft in Berührung gebracht, wieder in Farbstoff übergehe. Es ist dies jedoch nicht der Fall, sondern auch hier ist es die Einwirkung von Ammoniak, welche die Grünfärbung der unteren Schichten bewirkt. Farbstoff und Ammoniak werden nur an der Oberfläche gebildet. Der erstere wird aber viel eher gebildet und kann deshalb früher und reichlicher in die unteren Flüssigkeitsschichten dringen als das letztere. Da aber der erstere nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ammoniak wirklich fluoresciert, so wird er in den unteren Schichten anfangs nicht wahrgenommen. Es fehlt also in den unteren Schichten der Kulturflüssigkeit aus Ammoniakmangel die Fluorescenz, die in den oberen Schichten sehr deutlich zu beobachten ist. Beim Umschütteln ist die alkalische Reaktion überall gleich gross und die ganze Flüssigkeit fluoresciert infolge dessen gleichmässig moosgrün. Ein weiterer Versuch hat diese Annahme bestätigt. Ein Scheidetrichter mit ungefähr 100 ccm Inhalt wurde zur Hälfte mit 10% Nährgelatine gefüllt, die Eingussöffnung an Stelle des Glasstöpsels mit Watte verschlossen und wie üblich sterilisiert. Dann wurde eine Stichkultur von Bacillus pyocyaneus angelegt und so lange wachsen gelassen, bis vollständige Verflüssigung der Gelatine eingetreten war. Das Aussehen der Kultur war dann dasselbe wie das einer Reagensglaskultur. Der untere nicht fluorescierende Teil der Lösung wurde hierauf abgelassen und tüchtig geschüttelt. Es zeigte sich keine Fluorescenz und die Annahme Ledderhose's war mithin unrichtig. Bei geringem Zusatz von Ammoniak hingegen trat der Farbstoff in voller Deutlichkeit auf.

Die Bedeutung von Ammoniak für das Auftreten der grünen Fluorescenz zeigen noch folgende Versuche:

Eine Gelatinestrichkultur wurde nach vierstündigem Wachstum — in dieser Zeit ist keine Spur von Fluorescenz zu beobachten — Ammoniakdämpfen ausgesetzt. Hierbei tritt fast sofort die grüne

Fluorescenz auf. Dieser Versuch zeigt mithin, dass bei der geringsten Entwicklung des Organismus sofort die Produktion des Pigmentes beginnt. Die Fluorescenz ist jedoch deshalb noch nicht sichtbar, weil die zu ihrem Auftreten notwendige Alkalimenge noch nicht gebildet ist.

Eine ältere, prächtig himmelblau fluorescierende Kultur zeigt nach Einwirkung von Ammoniak schön moosgrüne Fluorescenz. Zu gleicher Zeit ist eine Gelbfärbung des Substrates zu erkennen.

Eine Bouillonkultur, 5 Minuten im Wasserbade einer Temperatur von 57° ausgesetzt, zeigt nach Rohrer (11, 11, 333) an Stelle der vorher sichtbaren grünen Fluorescenz jetzt eine mehr blaugrüne. Diese Erscheinung ist dadurch zu erklären, dass durch diese Erwärmung das Ammoniak verjagt wird. Wird letzteres beim Erkalten zugesetzt, so tritt die Fluorescenz in ihrer ursprünglichen Färbung wieder auf.

Bei der Untersuchung über die Ursachen, welche das verschiedene Wachstum und die eigentümliche Farbstoffproduktion auf einer Kartoffelkultur bedingen, zeigte es sich, dass dieselben in hohem Grade von der sauern Reaktion des Nährbodens abhängen, während die Nährstoffe selbst nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es wird dies durch das Verhalten der verschiedenen Arten auf saurer Gelatine resp. Agar bewiesen. Auf diesen Kulturen sind sowohl Wachstum als auch Farbe der Kolonie meistens die gleichen wie bei einer Kartoffelkultur. Bei den beiden erstgenannten Nährböden ist infolge ihrer Durchsichtigkeit das Auftreten des gelben Farbstoffes und nach einiger Zeit das der blauen und grünen Fluorescenz zu erkennen, was bei der Kartoffelkultur unmöglich ist.

Die Produktion des fluorescierenden Farbstoffes erfolgt sofort nach der Anlage einer Kultur, und die Fluorescenz kann jeder Zeit durch Einwirkung von Ammoniakdämpfen oder von Ammoniakflüssigkeit hervorgerufen werden. Es ist dies bei jedem sauren Nährboden ohne Ausnahme möglich. Auch Bacillus pyocyaneus β macht hiervon keine Ausnahme. Die Annahme von Ernst, der das verschiedene Verhalten einer α- und β-Kartoffelkultur gegen Ammoniak als Unterscheidungsmerkmal angiebt, ist mithin nicht zutreffend.

Die Versuche auf saurer Gelatine sind der direkte Beweis, dass die Nährstoffe bei der Kartoffelkultur ohne jede Bedeutung für die veränderten Verhältnisse sind und die saure Reaktion allein masgebend ist. Infolge dessen muss auch angenommen werden, dass in saurer Nährlösung der gleiche Farbstoff entsteht wie auf Kartoffel oder saurer Gelatine. Da nun aus einer solchen Kulturflüssigkeit stets nur der normale Farbstoff erhalten werden konnte,

so muss die auf Kartoffel sich zeigende Färbung dem gleichen Pigment zugeschrieben werden.

Bacillus pyocyaneus bildet auf Kartoffeln eine „rehfarbene" Auflagerung, welche einen besonderen Farbstoff, das Pyoxanthin, enthalten soll. Wahrscheinlich ist dasselbe aber mit dem von allen anderen Nährböden erhaltenen vollkommen identisch. Ich selbst konnte einen neuen Farbstoff nicht isolieren, auch bildet Bacillus pyocyaneus in sauren Nährlösungen nur einen und zwar den normalen Farbstoff. Die Kolonien auf Kartoffel unterscheiden sich in ihrer Färbung von denen auf sauerm Agar gewachsenen nicht im mindesten.

Es ist noch besonders hervorzuheben, dass auch aus saurer Lösung ein gelber Farbstoff erhalten wurde. Da durch Einwirkung von Ammoniak auf eine blau fluorescierende Kultur neben der grünen Fluorescenz stets noch eine Gelbfärbung des Substrates verbunden ist, so könnte infolge dessen angenommen werden, dass der gelbe Farbstoff erst durch Einwirkung des Alkalis entstünde. Dass dieses nicht der Fall ist, lässt sich durch eine Kultur in der sauren Nährlösung beweisen. Hier hat infolge der stets sauern Reaktion der entstehende Farbstoff nie Gelegenheit, durch Ammoniak verändert zu werden; trotzdem wird das gelbe Pigment gebildet.

Die direkte Einwirkung freier Säure auf den Farbstoff zeigt sehr schön die Kultur einer fluorescierenden Art zugleich mit einem Säurebildner. An der Stelle, an welcher die Ausscheidung der Säure die Ammoniakproduktion übertrifft, ist nicht die geringste Fluorescenz sichtbar. Später erscheint in ganz normaler Weise der gelbe Farbstoff, da dieser in keiner Weise durch Säure verändert wird. Herrscht jedoch die Ammoniakproduktion vor, so zeigt sich wie gewöhnlich die blaue, dann die grüne Fluorescenz und die Gelbfärbung der Gelatine.

Die Versuche mit Nährmedien, denen reducierende Substanzen zugesetzt waren, gaben wie früher schon erwähnt, negative Resultate. Sie zeigen trotzdem eine Reihe eigentümlicher Eigenschaften der fluorescierenden Bakterien.

In 2 und 4% Traubenzuckergelatine ist das Aussehen der Kolonie bedeutend verschieden von dem auf gewöhnlicher Gelatine. Fluorescenz tritt viel später oder gar nicht auf, doch ist nach 8—14 Tagen eine Gelbfärbung und später eine Orangefärbung des Nährbodens zu beobachten. Diese Veränderungen sind darauf zurückzuführen, dass die fluorescierenden Arten die Fähigkeit besitzen, den vorhandenen Traubenzucker in Säure (Milchsäure) überzuführen. Hierfür spricht sowohl das veränderte Wachstum, welches

die grösste Ähnlichkeit mit dem auf saurer Gelatine zeigt, als auch der direkte Nachweis mit Lackmuspapier. Das Ausbleiben der Fluorescenz ist hiedurch vollkommen erklärlich. Der Farbstoff wird jedoch gebildet und kann durch Ammoniak sofort hervorgerufen werden. Diese Neutralisation der Säure kann auch durch den Organismus selbst erfolgen und je nachdem dieser ein starker oder schwacher Alkalibildner ist, früher oder später oder gar nicht.

In Resorcin erscheinen die einzelnen Färbungen wie in reiner Fleischwasserpeptongelatine. Dagegen zeigen manche Arten insoferne eine Verschiedenheit, als ihre Kolonien in ganz charakteristischer Weise wachsen.

Ein Zusatz von ameisensaurem Natrium zu Nährgelatine bewirkt stets, dass die blaue Fluorescenz nur kurze Zeit sichtbar ist und die grüne Färbung schon am 2. Tage an ihre Stelle tritt. Es wird also bei Anwesenheit dieses Salzes die Ammoniakbildung entschieden beschleunigt. Es ist dies auffallend, da Kulturflüssigkeiten mit ameisensaurem Ammon als Nährstoff sich vollständig ungeeignet zeigten.

Bei den Kulturen der fluorescierenden Arten in Hydrochinongelatine ist ein ganz eigentümliches Verhalten zu erkennen. In schräg erstarrtem Nährboden tritt am 2. Tage in normaler Weise die blaue Fluorescenz auf. In den nächsten Tagen beginnt an der Stelle, an welcher sonst die grüne Fluorescenz sich zeigt, eine tiefbraune Färbung zu erscheinen, die langsam ins Innere vordringt. Erst viel später tritt die grüne Fluorescenz auf. Diese unerwartete braunrote Färbung ist auf die Einwirkung des Ammoniaks auf Hydrochinon zurückzuführen: denn sowohl eine Hydrochinonlösung als eine ungeimpfte Hydrochinongelatine zeigen nach Zusatz von Ammoniak dieselbe Bräunung, wie die Kultur einer fluorescierenden Art. Das Auftreten der Färbung an der dünnsten Stelle der Kultur ist ein weiterer Beweis dafür, dass dort zuerst die Ansammlung des Ammoniaks erfolgt.

Hydrochinongelatine kann mithin als Reagens auf Alkalibildner dienen. Hierbei darf etwa eintretende Bräunung nicht ohne weiteres der Ammoniakwirkung zugeschrieben werden, da auch durch Oxydation des Hydrochinons die gleiche Färbung auftreten kann. Mithin ist nur ein negatives Resultat direkt beweisend, dass kein Alkalibildner vorliegt.

Nachdem es mir gelungen war, sämtliche Färbungen, welche in den Kulturen der fluorescierenden Bakterien auftreten, auf einen einzigen Farbstoff zurückzuführen, untersuchte ich, ob die Ausscheidung dieses Pigmentes für das Gedeihen des Organismus von

Wichtigkeit ist. Um diese Frage zu lösen, hielt ich mich nach dem Vorschlag von Gessard an einfache Nährlösungen. Bei der Variation der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle unter Beibehaltung der gleichen Nährsalze zeigen die einzelnen Arten ein ganz verschiedenes Verhalten. Bald ist eine sehr rasche Trübung der Flüssigkeit, verbunden mit Fluorescenz, zu beobachten, bald trübt sich die Nährlösung nur äusserst langsam, und die Färbung tritt trotzdem mit grosser Deutlichkeit auf. Oft findet sich intensive Trübung der Kulturflüssigkeit, doch nicht die geringste Spur von Farbstoff.

Das Verhalten der einzelnen Arten in den verschiedenen Nährlösungen ist sehr charakteristisch und lässt sich als vorzügliches diagnostisches Merkmal verwenden. Es ist hierbei hervorzuheben, dass die Merkmale dieser Kulturen in diesen einfach zusammengesetzten Nährlösungen bei weitem weniger veränderlich sind, als diejenigen auf festen Nährböden.

Ausser den seither erwähnten Eigenschaften lassen sich in den einzelnen Kulturflüssigkeiten noch verschiedene Färbungen erkennen. Bald ist lange Zeit die blaue Fluorescenz allein sichtbar, indem die grüne Farbe erst spät auftritt, bald erscheint nach wenigen Tagen gleich die grüne Fluorescenz. Da nun letztere erst in stark ammoniakalischen Flüssigkeiten auftritt, so zeigt dieses Verhalten dass die einzelnen Arten in den verschiedenen Nährlösungen nicht immer die gleichen Mengen Ammoniak bilden, d. h. dass je nach der vorhandenen Kohlenstoff- und Stickstoffquelle die Bakterien entweder gute oder schlechte Alkalibildner sind. So ist Bacillus pyocyaneus Ernst in Nährgelatine, Asparagin, Harnstoff und Mannit, citronensaurem Ammon ein schlechter Alkalibildner, und die blaue Fluorescenz ist mithin in diesen Nährmedien lange Zeit sichtbar, in Nähragar, bernsteinsaurem Ammon, Harnstoff und Traubenzucker ein guter Alkalibildner, und das Nährsubstrat fluoresciert nach kurzer Zeit schön moosgrün.

In allen Lösungen, welche nur blaue Fluorescenz zeigen, ist durch Zusatz von Ammoniak sofort die grüne Fluorescenz hervorzurufen; desgleichen wird aus einer Lösung, welche nur grüne Fluorescenz erkennen lässt, beim Isolieren stets der gelbe Farbstoff erhalten, der in neutraler Lösung blau fluoresciert.

Die einzelnen Färbungen treten zuerst an der Oberfläche der Nährlösung auf und schreiten langsam nach unten hin fort. Auf Grund dieses Verhaltens nimmt Nägeli die Produktion von Leukofarbstoff an, welcher erst durch Einwirkung des Luftsauerstoffs in den Farbstoff übergeführt würde. Die Annahme ist jedoch un-

richtig. Da die Entwicklung der fluorescierenden Bakterien nur in den Schichten vor sich geht, in welchen genügende Mengen von Sauerstoff vorhanden sind, so kann auch nur in diesen Schichten eine Farbstoffproduktion stattfinden. Der Farbstoff muss mithin an der Oberfläche zuerst auftreten. Die Annahme einer Bildung von Leukofarbstoff ist dabei ganz überflüssig. Auf diese Weise erklärt sich auch, dass nur an den Stellen des Wundverbandes, an welchen die Luft ungehindert zutreten kann, von Bacillus pyocyaneus der Farbstoff am reichlichsten gebildet wird und dass bei anaerobiotischen Kulturen kein Farbstoff entsteht.

Besonders schön lässt sich das Auftreten der Fluorescenz in sauren Nährlösungen beobachten. In der stark getrübten Flüssigkeit erscheint früher oder später ein schön grün fluorescierender Ring direkt an der Oberfläche. Derselbe grenzt sich bei ruhigem Stehen scharf gegen die übrige ungefärbte Schicht ab. Beim Umschütteln einer solchen Kultur verschwindet die Fluorescenz so lange, als die vorhandene Säure von dem gebildeten Ammoniak noch nicht neutralisiert wird. Ist aber die Ammoniakmenge so gross geworden, dass die ganze Flüssigkeit beim Umschütteln alkalisch wird, so teilt sich auch die grüne Fluorescenz der ganzen Nährlösung mit. Da der an der Oberfläche auftretende Ring beim Umschütteln wieder verschwindet, so zeigt dieser Versuch, dass die Ammoniakbildung wie die Farbstoffbildung nur an den Stellen stattfindet, an denen der Organismus normale Entwicklung zeigt.

Kulturen in sauren Nährlösungen lassen ferner erkennen, dass die Ammoniakproduktion keine so geringe ist, wie oft angenommen wird. So neutralisieren einzelne Arten (Bacillus pyocyaneus, Bacillus fluorescens albus, Bacillus erythrosporus) in kurzer Zeit die zugesetzte Menge Säure und eine ganze Zeit lang können neue gewisse Mengen Säure hinzugefügt werden, die stets wieder neutralisiert werden. Wann dieser Zustand eingetreten ist, zeigt der Farbstoff selbst als Indikator an. — Bei Bacillus pyocyaneus Gessard 3, welcher wie früher erwähnt, seine Farbstoffproduktion verloren hatte, wurde geprüft, ob er auch kein Ammoniak mehr bildet. Da er nun selbst kein Pigment bildete, wurde an dessen Stelle der von Bacillus pyocyaneus Ernst produzierte Farbstoff als Indicator verwendet. Dieser war als solcher vorzüglich geeignet. Der Versuch ergab, dass noch reichliche Mengen Ammoniak gebildet wurden.

Ausser den Versuchen, bei denen nur die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wechselte, wurden auch solche ausgeführt, in denen ein oder mehrere Nährsalze weggelassen wurden. Als organische Nährstoffe wurde bernsteinsaures Ammon verwendet, da dieses für

sämtliche fluorescierenden Arten als gute Nährquelle dient. Als Nährsalze kamen stets Chlorcalcium, Magnesiumsulfat und Kaliumphosphat zur Verwendung.

Wird Chlorcalcium weggelassen, so ist bei sämtlichen Arten das Wachstum und die Farbstoffproduktion dieselbe, wie mit Chlorcalcium. Diese Verbindung ist mithin vollkommen unwesentlich. Beim Fehlen des Phosphats hingegen ist die Flüssigkeit nur leicht getrübt und keine Spur von Fluorescenz ist zu beobachten. Setzt man eine geringe Menge phosphorsaures Salz zu, so zeigt sich sofort wieder ein gutes Wachstum, und die grüne Fluorescenz wird in normaler Weise gebildet.

Sämtliche Resultate stimmen mithin vollkommen mit denen überein, welche Gessard bei Bacillus pyocyaneus allein feststellte. Infolge dessen müssten seine Ansichten über die Bedeutung der Phosphorsäure als richtig anerkannt werden, wenn dieselben nicht zu einseitig wären, weil er die Bedeutung anderer Nährsalze nicht genügend würdigte. Lässt man nämlich an Stelle des Phosphats das Magnesiumsulfat weg, so ist bei sämtlichen Raçen das Bacillus pyocyaneus sowie auch des Bacillus viridans nicht die geringste Spur von Farbstoff zu beobachten. Bei den übrigen Arten wird das Pigment noch in geringer Menge gebildet, doch unterbleibt dies sofort, wenn noch Chorcalcium weggelassen wird und Kaliumphosphat allein vorhanden ist. Hierdurch ist direkt bewiesen, dass bei Abwesenheit von Fluorescenz nie auch auf Abwesenheit von Phosphorsäure geschlossen werden darf, wie Gessard es gethan hat. Für das Zustandekommen der Fluorescenz ist also Magnesiumsulfat mindestens ebenso wichtig wie Kaliumphosphat.

Die Bedeutung von Magnesium für die Bildung des Farbstoffes zeigt folgender Versuch: Gessard konnte in den Peptonen, in welchen keine Fluorescenz auftrat, durch Zusatz von Kaliumphosphat dieselbe hervorrufen. In hiesigem Laboratorium wird nun ein Pepton verwendet, in welchem Bacillus pyocyaneus gleichfalls keinen Farbstoff bildet. Ein Zusatz von Phosphat blieb ohne jeden Erfolg. Wurde jedoch Magnesiumsulfat hinzugefügt, so trat die grüne Fluorescenz in normaler Weise auf. Das verwendete Pepton enthielt mithin wohl Phosphat, jedoch kein Magnesuim. Eine Analyse des Körpers hat diese Annahme bestätigt.

Die Versuche mit Variierung der Nährsalze bestätigen ferner die Resultate Nägeli's, welcher fand, dass bei niederen Pflanzen im Gegensatze zu den höheren, das Calcium durch Magnesium und umgekehrt Magnesium durch Calcium ersetzt werden kann. Für die fluorescierenden Arten trifft dies jedoch nur, soweit es sich um

das Wachstum handelt, zu. Für die Bildung des Farbstoffes ist es nicht gleichgültig, ob Magnesium oder Calcium verwendet wird.

Fehlt Phosphorsäure in der Nährlösung, so ist wie schon erwähnt, keine Fluorescenz zu erkennen, doch die ganze Flüssigkeit ist leicht blau gefärbt. Bei Bacillus pyocyaneus konnte Gessard diese Färbung gleichfalls beobachten, und er nimmt an, dass diese Färbung auf Pyocyanin zurückzuführen sei. Er sagt, beim Fehlen von Phosphat wird kein fluorescierender Farbstoff, sondern Pyocyanin gebildet. Sämtliche fluorescierende Arten zeigen nun dieselbe Färbung und zwar nicht nur beim Fehlen von Phosphat, sondern überhaupt in jeder Lösung, in welcher kein fluorescierender Farbstoff auftritt. Diese Färbungen sind jedoch nie auf Pyocyaninbildung, sondern einfach auf Lichtbrechungserscheinungen zurückzuführen, indem jede leicht getrübte Flüssigkeit einen blauen Schimmer zeigt. Zudem konnte aus solchen Kulturen nie Pyocyanin isoliert werden, und die Blaufärbung verschwand ausserdem sofort, wenn sich die Nährlösung klärte und die Bakterien sich zu Boden gesetzt hatten.

Bei den Versuchen mit wechselnden Mengen Kaliumphosphat ergiebt sich, dass bei der geringsten Menge dieses Salzes der Farbstoff gebildet wird. Bei geringem Phosphatgehalt fluoresciert die Nährlösung blau, bei mehr Kaliumphosphat blaugrün, bei noch grösserer Menge rein moosgrün. Diese Resultate zeigen gleichfalls Übereinstimmung mit denen, welche Gessard an Bacillus pyocyaneus feststellte, doch ist dies Verhalten auf andere Ursachen zurückzuführen, als Gessard annimmt: bei geringem Phosphatgehalt soll Pyocyanin, bei mehr Pyocyanin und fluorescierendes Pigment, bei viel nur das letztere auftreten. Da jedoch in sämtlichen Nährlösungen, in denen nur blaue Fluorescenz zu beobachten ist, durch Ammoniak sofort die grüne Färbung hervorgerufen werden kann, so bewirkt die geringe Menge an Phosphorsäure nicht die Produktion eines andern Pigmentes, sondern nur eine verminderte Produktion an Ammoniak. Bei viel Kaliumphosphat soll nach Gessard nur der fluorescierende Farbstoff gebildet werden. Beim Isolieren des Pigmentes aus solchen Nährlösungen wird jedoch der normale Farbstoff erhalten, welcher schön blaue Fluorescenz zeigt.

Bei wechselnden Mengen von Magnesiumsulfat treten bezüglich der Farbstoffbildungen ähnliche Erscheinungen auf wie bei wechselnden Mengen von Kaliumphosphat. Bacillus fluorescens putidus weicht hiervon vollständig ab, indem er zur Bildung seines Farbstoffes eine ganz bestimmte Menge an Magnesiumsulfat bedarf. Nur bei einem Gehalt von 0,04 % tritt die Fluorescenz auf. Grössere

oder geringere Mengen Phosphorsäure bewirken keine Veränderung in der Farbstoffproduktion. Die Entwicklung des Organismus ist bei wenig Magnesiumsulfat eine vorzügliche.

Die Erreger der blauen Milch, Bacterium syncyaneum, schliesst sich bezüglich seiner Fähigkeit, einen fluorescierenden Farbstoff zu bilden, eng an die Gruppe der übrigen fluorescierenden Bakterien an. Ausserdem bildet er einen stahlblauen Farbstoff, welcher in Milch die bekannte Blaufärbung verursacht. Von den beiden Formen, die zur Untersuchung gelangten, bildet nur die α-Form beide Pigmente, während die β-Form den stahlblauen Farbstoff allein produziert.

Die beiden Farbstoffe besitzen folgende Eigenschaften:

Der fluorescierende Farbstoff zeigt bei seinem Auftreten die gleichen Färbungen wie die übrigen fluorescierenden Arten. Es erscheint mithin zuerst die blaue Fluorescenz, die dann durch fortgesetzte Ammoniakproduktion des Organismus in grün übergeht. Das Auftreten der grünen Fluorescenz erfolgt um so rascher, je dünner die Schicht des Nährbodens ist. Zugleich ist eine Gelbfärbung des Substrates zu erkennen. In älteren Kulturen zeigt sich oft eine Orangefärbung und eine dunklere Fluorescenz. Der gelbe Farbstoff, welcher aus Asparaginlösuug erhalten wurde, besitzt die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der aller übrigen fluorescierenden Arten. Da dieses Pigment gegen Oxydationsmittel beständig ist, glaube ich annehmen zu dürfen, dass Hüppe's Ansicht unrichtig ist, wenn er das fluorescierende Pigment als niedere Oxydationsstufe des stahlblauen ansieht. Auch spricht gegen diese Annahme die grosse Übereinstimmung des fluorescierenden Farbstoffes mit dem der andern Arten, bei denen jedoch nichts derartiges bekannt ist.

Der stahlblaue Farbstoff konnte wegen seiner Unbeständigkeit nicht isoliert werden. Derselbe zeigt je nach der Reaktion des Nährmediums ein ganz verschiedenes Aussehen. Bei saurer Reaktion allein besitzt derselbe eine rein stahlblaue Farbe. Bei geringem Säuregrad ist die Färbung mehr blauschwarz, bei neutraler Reaktion schwarz und schliesslich bei alkalischer Reaktion braunschwarz. Die Bildung des Farbstoffes erfolgt am reichlichsten in sauren Nährmedien. Bei Nährböden, welche von Anfang an stark alkalische Reaktion zeigen, wird der Farbstoff nur in geringer Menge gebildet.

In Nährlösungen ist meistens vor dem Auftreten des stahlblauen Farbstoffes eine schöne Rosafärbung zu beobachten. Besonders deutlich zeigt sich dieselbe bei Kulturen der β-Form in Nährlösungen, welche wenig Magnesiumsulfat enthalten. Diese

Färbung scheint durch Einwirkung von Ammoniak auf geringe Mengen des stahlblauen Farbstoffes hervorgerufen zu werden.

Die Kulturen der α-Form des Bacterium syncyaneum zeigen folgendes Verhalten: In der gewöhnlichen alkalischen Gelatine sind nach einander sämtliche Färbungen des fluorescierenden Farbstoffes deutlich sichtbar. Der stahlblaue Farbstoff wird infolge der alkalischen Reaktion des Nährbodens nur in geringer Menge gebildet; er besitzt dann auch eine mehr braune Farbe.

Auf Agar ist das Auftreten der Färbungen ähnlich wie in Gelatine, doch der stahlblaue Farbstoff wird hier reichlicher gebildet, und seine Farbe spielt mehr in's schwarze hinüber.

Auf der sauer reagierenden Kartoffel sind je nach der verwendeten Kartoffelart die verschiedensten Nuancen des stahlblauen Farbstoffes sichtbar, und Heim hat hierüber eingehende Versuche angestellt. Diese Veränderungen sind jedoch lediglich in dem verschiedenen Säuregrad der einzelnen Kartoffelarten zu suchen.

Versuche mit saurer Gelatine lassen die Bildung der Pigmente sehr schön erkennen. Zuerst erscheint der stahlblaue Farbstoff und dringt rasch in das Substrat vor. Derselbe geht bei fortschreitender Kultur infolge der gleichzeitigen Ammoniakbildung von stahlblau in blauschwarz, schwarz und braunschwarz über. Dann wird auch die blaue und später die grüne Fluorescenz sichtbar. Lässt man vor diesem Zeitpunkt Ammoniak auf die Kultur einwirken, so tritt die Fluorescenz sofort auf, wodurch bewiesen wird, dass der fluorescierende Farbstoff auch bei Bacterium syncyaneum von Anfang an gebildet wird.

Am schönsten lassen sich sämtliche Färbungen, die in einem Nährboden auftreten können, bei der Kultur von Bacterium syncyaneum zusammen mit Bacillus acidi lactici beobachten. Bei der bereits beschriebenen Anordnung ist zu gleicher Zeit im oberen Teile des Nährbodens, wo die Ausscheidung der Säure allein erfolgt, der stahlblaue Farbstoff, im unteren Teile hingegen, wo sich Bacterium syncyaneum frei entwickeln kann, die blaue und später grüne Fluorescenz sowie die Gelbfärbung der Gelatine sichtbar.

In 2 und 4% Traubenzuckergelatine treten die Färbungen in gleicher Weise wie in saurer Gelatine auf. Der Organismus besitzt mithin wie alle fluorescierenden Arten die Fähigkeit, Traubenzucker zu Milchsäure (?) zu oxydieren.

In Nährböden, welche ameisensaures Natrium enthalten, ist wie bei den übrigen Arten nur kurze Zeit die blaue Fluorescenz sichtbar, indem an deren Stelle meistens am 2. Tage ihres Auftretens die grüne Färbung zu beobachten ist.

Kulturen in Hydrochinongelatine zeigen die gleiche dunkelrote Färbung wie alle fluorescierenden Arten, hervorgerufen durch Einwirkung von Ammoniak auf Hydrochinon. Andere Färbungen sind infolge der tief dunkeln Farbe der Gelatine nicht zu beobachten.

Die β-Form des Bacterium syncyaneum bildet nur noch das stahlblaue Pigiment, weches je nach der Reaktion des Nährbodens in verschiedenen Nuancen auftritt.

Diese Varietät ist gleichfalls ein Alkalibildner wie die α-Form.

Auf alkalischer Nährgelatine und Agar ist eine schwarze später schwarzbraune Färbung zu erkennen.

In saurer Gelatine erscheint zuerst die stahlblaue Farbe, die später in braunschwarz übergeht. Versuche mit Säure- und Alkalibildern zugleich zeigen an der Stelle, an welcher die Säure auftritt, das schön stahlblaue Pigment, an der, wo sich Bacterium syncyaneum allein entwickelt, in normaler Weise eine braunschwarze Färbung.

In Nährböden, welche Resorcin oder ameisensaures Natrium enthalten, findet zwar gute Entwicklung des Organismus statt, doch kann nur unbedeutende Braunfärbung beobachtet werden.

Auf Hydrochinongelatine ist kein Wachstum zu erkennen. Bacterium syncyaneum unterscheidet sich hierdurch von allen andern Arten.

In den verschiedenen Nährlösungen zeigen beide Raçen meistens eine gute Entwicklung. Die α-Form bildet in Aspargin, bernsteinsaurem, weinsaurem oder milchsaurem Ammon den fluorescierenden Farbstoff. In den beiden zuletzt genannten Lösungen wird auch der stahlblaue Farbstoff produziert, allerdings jedoch mit verschiedener Stärke. In Asparagin hingegen ist nie dieses Pigmont zu erkennen und es gelang mir beim Isolieren des fluorescierenden Farbstoffes nie, die Anwesenheit des anderen nachzuweisen.

In citronensaurem Ammon erscheint nur eine schwarze Färbung. Fluorescenz wird nie gebildet. Es entspricht dies vollkommen dem Verhalten der übrigen fluorescierenden Bakterien, welche mit Ausnahme von Bacillus erythrosporus gleichfalls wenig oder keinen Farbstoff erzeugen.

In Harnstoff und Traubenzucker tritt mit voller Deutlichkeit der stahlblaue Farbstoff auf. Es wird mithin starke Säuerung hervorgerufen, die jedoch später durch das gebildete Ammoniak neutralisiert wird.

Während in alkalischer Asparaginlösung nur das fluorescierende Pigment gebildet wird, treten in saurer Lösung die gleichen Färbungen wie in Harnstoff und Traubenzucker auf.

Bei der Variierung der Nährsalze erscheint beim Fehlen von Chlorcalcium das fluorescierende Pigment in normaler Weise, der stahlblaue Farbstoff wird hingegen merkwürdiger Weise viel reichlicher gebildet als bei Gegenwart von Chlorcalcium.

Das Fehlen von Magnesiumsulfat oder Magnesiumsulfat und Chlorcalcium bewirkt wie bei den übrigen Arten das vollständige Ausbleiben der Fluorescenz, trotzdem Phosphorsäure zugegen ist. Auch das Vorhandensein des stahlblauen Farbstoffes ist nur an einer schwachen Rosafärbung der Nährlösung zu erkennen.

Beim Fehlen von Kaliumphosphat wird kein Farbstoff gebildet.

Mithin zeigt Bacterium syncyaneum das gleiche Verhalten wie Bacillus pyocyaneus, indem sowohl Magnesiumsulfat wie Kaliumphosphat zur Bildung des fluorescierenden Farbstoffes absolut notwendig sind.

Die geringsten Mengen Phosphat genügen, um den fluorescierenden Farbstoff auftreten zu lassen. Der stahlblaue Farbstoff wird jedoch bei wenig Kaliumphosphat durchaus nicht so reichlich gebildet wie bei einem grösseren Gehalte dieses Salzes.

Auch die geringste Menge Magnesiumsulfat ist ausreichend, um die Fluorescenz hervorzurufen. Das stahlblaue Pigment erscheint hierbei merkwürdiger Weise viel reichlicher als bei mehr Magnesiumsulfat.

Die β-Form des Bacterium syncyaneum bildet trotz eines guten Wachstums in den einzelnen Nährlösungen nur in sehr geringer Menge das stahlblaue Pigment.

In Asparagin entsteht kein Pigment, ganz entsprechend der Kultur der α-Form, die hierin nur den fluorescierenden Farbstoff bildet.

In Harnstoff und Traubenzucker allein zeigt sich eine deutlich stahlblaue Färbung. Dem Auftreten dieses Pigments geht meist eine deutliche Rosafärbung voraus.

In saurer Asparaginlösung wird kein Farbstoff gebildet. Der Organismus zeigt hierdurch ein abweichendes Verhalten.

Eine Nährlösung, welche milchsaures Ammon enthält, zeigt zuerst eine Rosafärbung. Später ist dieselbe deutlich gelb gefärbt. Beim Abimpfen auf alkalische Nährgelatine produziert der Organismus wieder fluorescierenden Farbstoff; hierdurch ist die Möglichkeit gegeben, dem Bacterium synoyaneum β die verloren gegangene Eigenschaft, fluorescierenden Farbstoff zu bilden, wieder anzuzüchten.

Bei der Variirung der Nährsalze entsteht beim Weglassen von Chlorcalcium keine Veränderung. Fehlt Magnesiumsulfat, oder Kaliumphosphat, wird kein stahlblauer Farbstoff gebildet. Bei geringen

Mengen Magnesiumsulfat oder Kaliumphosphat erscheint unerwartet sehr schön eine Rosafärbung der ganzen Flüssigkeit. Später erscheint die schwarze Farbe, welche hier viel intensiver ist, wie wenn die Nährlösung mehr von diesen Salzen enthielte.

Die Verhältnisse, unter denen der fluorescierende Farbstoff gebildet wird, sind nicht bei allen Arten die gleichen und die Verschiedenheiten sind so constant, dass sich die einzelnen Arten dadurch ganz gut unterscheiden lassen. Ich habe im Nachstehenden versucht, in tabellarischer Weise eine Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften der von mir untersuchten fluorescierenden Bakterienarten, soweit es sich um die Stärke der getrübten Kulturflüssigkeit und die Bildung des Farbstoffes handelt, zu geben. Dieselbe dürfte dazu beitragen, die Unterscheidung der so nahe verwandten Arten zu erleichtern.

<table>
<tr><th></th><th>Harnstoff und Mannit</th><th>Harnstoff und Traubenzucker</th><th>Citronensaures Ammon</th><th>Weinsaures Ammon</th><th>Buttersaurer Kalk</th></tr>
<tr><td>Bac. fluoresc. tenuis</td><td>langsame, aber starke Trübung, moosgrüne Fluorescenz.</td><td>unbedeutende Trübung, blaue Fluorescenz.</td><td>starke Trübung, fast keine Fluorescenz.</td><td>unbedeutende Trübung. keine Farbstoffbildung.</td><td>keine Entwicklung</td></tr>
<tr><td>Bac. fluoresc. putidus</td><td colspan="2">keine Entwicklung</td><td>wie Bac. fluor. tenuis.</td><td colspan="2">keine Entwicklung</td></tr>
<tr><td>Bac. fluoresc. albus</td><td colspan="2">leichte Trübung, keine Farbstoffproduktion</td><td colspan="2">starke Trübung, moosgrüne Fluorescenz.</td><td>keine Entwicklung</td></tr>
<tr><td>Bac. erythrosp.</td><td colspan="2">leichte Trübung, keine Farbstoffproduktion</td><td>starke Trübung, moosgrüne Fluorescenz.</td><td colspan="2">keine Entwicklung.</td></tr>
<tr><td>Bac. pyocyaneus</td><td colspan="3">Alle 4 Varietäten zeigen starke Trübung und Farbstoffproduktion; die Fluorescenz ist verschieden, bald blau, bald moosgrün, je nachdem eine Raçe vorliegt.</td><td>unbedeutende Trübung, keine Farbstoffbildung.</td><td>keine Entwicklung, ausgenommen Variet. Ernst: blaugrüne Fluorescenz.</td></tr>
<tr><td>Bac. viridans</td><td colspan="2">starke Trübung, moosgrüne Fluorescenz.</td><td>starke Trübung, keine Farbstoffbildung</td><td colspan="2">keine Entwicklung.</td></tr>
</table>

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1) Sämtliche fluorescierenden Bakterien zeigen in alkalischer Gelatine zuerst eine himmelblaue, später eine moosgrüne Fluorescenz und zugleich mit der letzteren eine Gelbfärbung des Substrates. Alte Kulturen besitzen ein orangerotes Aussehen und eine dunkelgrüne Fluorescenz. Die letzten beiden Eigenschaften zeigt nur Bacillus fluorescens putidus in seinen Kulturen nicht.

2) Alle diese Färbungen sind auf einen gelben Farbstoff zurückzuführen, dessen conc. wässrige Lösung orangegelb und dessen verdünnte gelb ist. Beide Flüssigkeiten fluorescieren blau. Durch Zusatz eines Alkalis ist die Fluorescenz je nach der Concentration dunkelgrün oder moosgrün.

3) Sämtliche Arten produzieren den gleichen Farbstoff.

4) Sie sind alle Alkalibildner. Die gebildete Ammoniakmenge ist bei manchen Arten eine ziemlich bedeutende. Das Ammoniak bewirkt, dass in den Kulturen an Stelle der blauen die grüne Fluorescenz tritt.

5) Die Annahme Nägeli's, Ledderhose's und Kunz' von Leukofarbstoffbildung und der Versuche dieser Autoren, die einzelnen Färbungen auf Oxydationserscheinungen zurückzuführen, hat sich als nicht richtig erwiesen.

6) Bacillus pyocyaneus Ernst bildet in Nährlösungen nur einen Farbstoff und die in den Kulturen auftretenden Färbungen sind wie bei den anderen Arten nur auf dieses eine Pigment zurückzuführen, während von den anderen Forschern verschiedene Farbstoffe angenommen werden.

7) In Kartoffelkulturen und auf saurer Gelatine wird derselbe Farbstoff wie in alkalischen Nährböden gebildet. Durch Einwirkung von Ammoniak ist jeder Zeit die Fluorescenz hervorzurufen.

8) Die α- und die β-Form des Bacillus pyocyaneus unterscheiden sich nicht durch veränderte Farbstoffproduktion, sondern durch die verschieden grosse Menge Ammoniak, welche beide bilden. Die α-Form ist ein guter, die β-Form ein schlechter Alkalibildner. Hinzufügen von Ammoniak zu einer Kultur der β-Form bewirkt, dass sie einer α-Kultur in ihrem Aussehen gleich wird.

9) Versuche mit einem Säurebildner und einem fluorescierenden Bakterium in derselben Kultur lassen sehr schön die Einwirkung freier Säure auf den fluorescierenden Farbstoff erkennen. Fluorescenz ist nicht zu erkennen, das gelbe Pigment tritt jedoch in normaler Weise auf.

10) Sämtliche Arten besitzen die Fähigkeit, Traubenzucker zu Säure zu oxydieren. Das später gebildete Ammoniak neutralisiert jedoch nach einiger Zeit die gebildete Säure.

11) Ein Zusatz von ameisensaurem Natrium zu gewöhnlicher Nährgelatine bewirkt eine Beschleunigung der Ammoniakproduktion.

13) In Hydrochinongelatine bilden sämtliche Arten eine braunrote Färbung, hervorgerufen durch Einwirkung von Ammoniak auf Hydrochinon. Ein solcher Nährboden kann demnach unter gewissen Bedingungen als Reagens auf Ammoniak dienen.

13) Das Verhalten der einzelnen Arten in Nährlösungen, welche verschiedene organische Nährstoffe enthalten, ist so charakteristisch, dass es als vorzügliches diagnostisches Merkmal zur Unterscheidung verwandter Arten dienen kann. Bernsteinsaures Ammon oder Asparagin sind für alle Arten gute Nährstoffe.

14) Je nach der vorliegenden Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle ist der gleiche Organismus bald ein guter, bald ein schlechter Alkalibildner. So ist Bacillus pyocyaneus Ernst in Nährgelatine ein schlechter, in bernsteinsaurem Ammon hingegen ein guter Alkalibildner.

15) Jeder Organismus zeigt nur an den Stellen, an welchen er mit dem Sauerstoff der Luft in Berührung kommt, Lebensäusserungen. Infolgedessen findet nur dort sowohl Farbstoff- als auch Ammoniakbildung statt.

16) Von den gewöhnlich verwendeten Nährsalzen ist Chlorcalcium vollkommen unwesentlich, Magnesiumsulfat und Kaliumphosphat hingegen ist für die Farbstoffbildung von grösster Bedeutung. Die Ansicht Gessard's, der nur Phosphorsäure als durchaus notwendig annimmt, ist unrichtig; auch darf beim Fehlen von Fluorescenz nie auch auf das Fehlen von Phosphorsäure geschlossen werden.

17) So lange es sich nur um die Entwicklung der einzelnen Arten handelt, ist die Ansicht Nägeli's vollkommen richtig, wenn er annimmt, Calcium kann durch Magnesium und umgekehrt ersetzt werden. Bei der Farbstoffbildung hingegen trifft dies nicht mehr zu und Magnesium kann nie durch Calcium vertreten werden.

18) Die Blaufärbung einer Kulturflüssigkeit von Bacillus pyocyaneus beim Fehlen von Phosphorsäure ist nie durch Pyocyanin verursacht, wie Gessard annimmt, sondern lediglich auf Lichtbrechungserscheinungen zurückzuführen.

19) Die geringste Menge Kaliumphosphat oder Magnesiumsulfat genügt, damit das fluorescierende Pigment gebildet wird. Da in solchen Nährlösungen meistens blaue Fluorescenz zu beobachten ist, bewirkt die geringe Menge Nährsalze demnach eine verminderte Ammoniakproduktion.

20) Bacterium syncyaneum besitzt die Fähigkeit zwei Farbstoffe zu bilden, einen fluorescierenden und einen stahlblauen. Der erstere zeigt mit dem der übrigen fluorescierenden Arten vollständige Übereinstimmung. Der stahlblaue Farbstoff lässt je nach der Reaktion des Nährbodens sämtliche Nuancen zwischen stahlblau und braunschwarz erkennen.

21) Der β-Form des Bacterium syncyaneum ist durch Kultivieren in milchsaurem Ammon und Überimpfen auf Nährgelatine die Fluorescenz wieder anzuzüchten.

Erklärung der Abkürzungen.

1 = F. Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen.
2 = Flügge, Microorganismen. 2. Aufl.
3 = Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte.
4 = Compt. rend. 1882.
5 = Eisenberg, Bakteriologische Diagnostik 1891.
6 = Kryptogamenflora von Schlesien. Pilze 1886.
7 = Zeitschrift für Hygiene.
8 = Reimann, Inaugural-Dissertation, Würzburg 1887.
9 = Allgemeine Medizin. Centralzeitung.
10 = Mitteil. d. Versuchstation f. Braur. und Mälz. Wien.
11 = Centralblatt f. Bakter. und Parasitenk. Jena.
12 = Archiv de Physiol.
13 = XVI. Gior. Soc. Ital. d'Igiene.
14 = Virchow's Archiv. Berlin.
15 = Zimmermann, die Bakterien unserer Trink- und Nutzwässer insbesondere des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung. 1890.
16 = F. Winkler und H. von Schrötter. Wien 1890.
17 = Bull. Scient. de la France et de la Belgique.
18 = Archiv für Hygiene.
19 = Monatshefte für prakt. Dermatologie.
20 = Tartaroff, die Dorpater Wasserbakterien. Inaug.-Dissert. 1891.
21 = Compt. rend. de l'Acad. de sciences.
22 = Deutsche Zeitschrift für Hygiene.
23 = Sitz. ber. der Wiener Akademie.
24 = Compt. rend. de soc. biol.
25 = La semaine médicale.
26 = Annales de l'Institut Pasteur.
27 = Neue Annalen der Mecklenburgischen landwirtschaftlichen Gesellschaft.

28 = Gurlt und Hertwig's Magazin für die gesamte Tierheilkunde.
29 = Journal für prakt. Chemie.
30 = Fortschritte der Medizin. Eberth und O. Vierordt.
31 = Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. Berlin.
32 = Münchner med. Wochenschrift.
33 = Lo Sperimentale.

Bei den Litteraturangaben im Texte bedeutet die erste Zahl das betreffende Werk, die 2. die Band- oder Jahreszahl, die 3. die Seitenzahl.

Die vorliegende Arbeit wurde im bakteriologischen Institute der Technischen Hochschule zu Karlsruhe auf Veranlassung des Herrn Professor Dr. Migula ausgeführt.

Es sei mir auch an dieser Stelle gestattet, Herrn Professor Dr. Migula für die mir erteilten Ratschläge und für die gütige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen besten Dank zu sagen.

Auch Herrn Professor Dr. L. Klein sei für das Interesse, das er dem Fortschreiten der Arbeit entgegenbrachte, bestens gedankt.